Vol. 3 DEZEMBRO - 1961 N.° 1

REVISTA

DO

INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE DO RECIFE
INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

	N S P	
	R A M	
	M M	
✓	(S)	✓

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
29 JAN 1963

IMPRENSA UNIVERSITÁRIA
RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL

Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife

FUNDADO EM 8 DE MARÇO DE 1952

Reitor da Universidade do Recife

PROF. DR. JOÃO ALFREDO GONÇALVES DA COSTA LIMA

Vice Reitor da Universidade do Recife

PROF. DR. NEWTON DA SILVA MAIA

Diretor do Instituto de Antibióticos

PROF. DR. OSWALDO GONÇALVES DE LIMA

SECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE PLANTAS SUPERIORES

Ivan Leôncio d'Albuquerque
José Sidney de Barros Coêlho

SECÇÃO DE FITOQUÍMICA

Oswaldo Gonçalves de Lima
Maria Helena Dália Maia

SECÇÃO DE ANÁLISE ORGÂNICA

Maria do Carmo Rocha Mesquita

SECÇÃO DE ANÁLISE INSTRUMENTAL

Manoel Antônio Pereira Borba
Maria Célia Pinto Navarro

SECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE ACTINOMICETOS

Marisa Machado Fernandes de Albuquerque
Francisco Décio de Andrade Lyra
Gessé Medeiros Maciel
Marline de Valésio Pinto
Beatriz Lucena

SECÇÃO DE BIOLOGIA E CÂNCER EXPERIMENTAL

Evans de Azevedo e Silva
Lizete Lins de Oliveira

SECÇÃO DE MICROBIOLOGIA

Vilneyde Mabel Malaquias de Queiroz
Carlos Antônio Albert
Ari Lins Lacerda

Estagiários Acadêmicos

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO RECIFE

Clécio Ferreira de Santana, Gileno Fernandes Xavier, Guido Rabelo Machado, José Darwin Diaz Sanchez e Silas de Carvalho.

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO RECIFE

Carlos Falcão Pereira Gomes, Dalair Souza Neto, Diná Matoso Gimino, Marluce Braga Silva.

ENDERÊÇO: Revista do Instituto de Antibióticos
da Universidade do Recife
Cidade Universitária
Recife — Pernambuco — Brasil

Vol. 3 DEZEMBRO - 1961 N.° 1

REVISTA

DO

INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE DO RECIFE
INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL

Características culturais: Observação aos dez dias. .

Meios	Micélio aéreo	Micélio vegetativo
Asparagina agar	branco a cinza claro	incolor a pálido
Emerson	branco a cinza claro	incolor a pálido
Aveia	cinza	incolor
Agar sintético	branco a cinza lilás	cinza claro
Agar sint. c/peptona	branco (escasso)	incolor
Dextrina	branco (escasso)	incolor
Agar nutritivo	—	incolor
Citrato de sódio	branco a cinza róseo	pálido
Lindenbein	cinza	pálido
Nitrato de sódio	cinza lilás	cinza claro
Amido agar	cinza claro	pálido
Agar com peptona	—	incolor
Celulose agar	cinza (escasso)	incolor
Sabouraud	—	incolor (crescimento rugoso)
Batata glicose agar	cinza claro (escasso)	incolor
Czapek	branco a cinza	cinza
Caldo simples	branco a cinza claro	col. submersas brancas
Agar sangue	—	pálido (crescimento rugoso e hemólise total)

A cêpa apresenta ausência total de pigmento solúvel nos meios utilizados acima.

PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

Em meio sólido de agar nutritivo, a cêpa mostrou forte antagonismo frente aos Gram-positivos e fungos leveduriformes, além de regular inibição dos ácidos-resistentes.

Em cultivo agitado a melhor fermentação se processou no meio de seguinte composição: glicose (Karo), 10 g; farinha de soja, 10 g; carbonato de cálcio 1 g; cloreto de sódio, 5 g; água destilada 100 ml, não havendo ajuste de pH. O inóculo utilizado, consistiu de suspensão de esporos conservados em terra estéril, a 5°C, atingindo sua melhor atividade às 96 horas de agitação com 500 — 1000 u/ml *S. aureus* W (método de diluição em série).

O líquido metabólico filtrado é submetido a vigorosa agitação com n-butanol (1/3 do volume). A fase orgânica livre de água é sêca ao vácuo e o produto de evaporação tratado por etanol, deixa um resíduo que é descartado. A fração solúvel, é evaporada à secura e submetida a uma partição (9 unidades) em sistema n-butanol: água, efetuando-se a separação de duas substâncias distintas de acôrdo com seus campos antagonistas.

A purificação dos antibióticos agora isolados, 1900-S (substância ativa para Gram-positivos e Gram-negativos) e 1900-C (substância com sua melhor atividade dirigida contra fungos leveduriformes), foi orientada da seguinte maneira:

A fração 1900-S é dissolvida em metanol absoluto e precipitada por éter etílico a baixa temperatura (7°C). Êste precipitado é ainda dissolvido em butanol saturado com água e cromatografado em coluna de sílicagel, recolhendo-se a segunda fração percolada

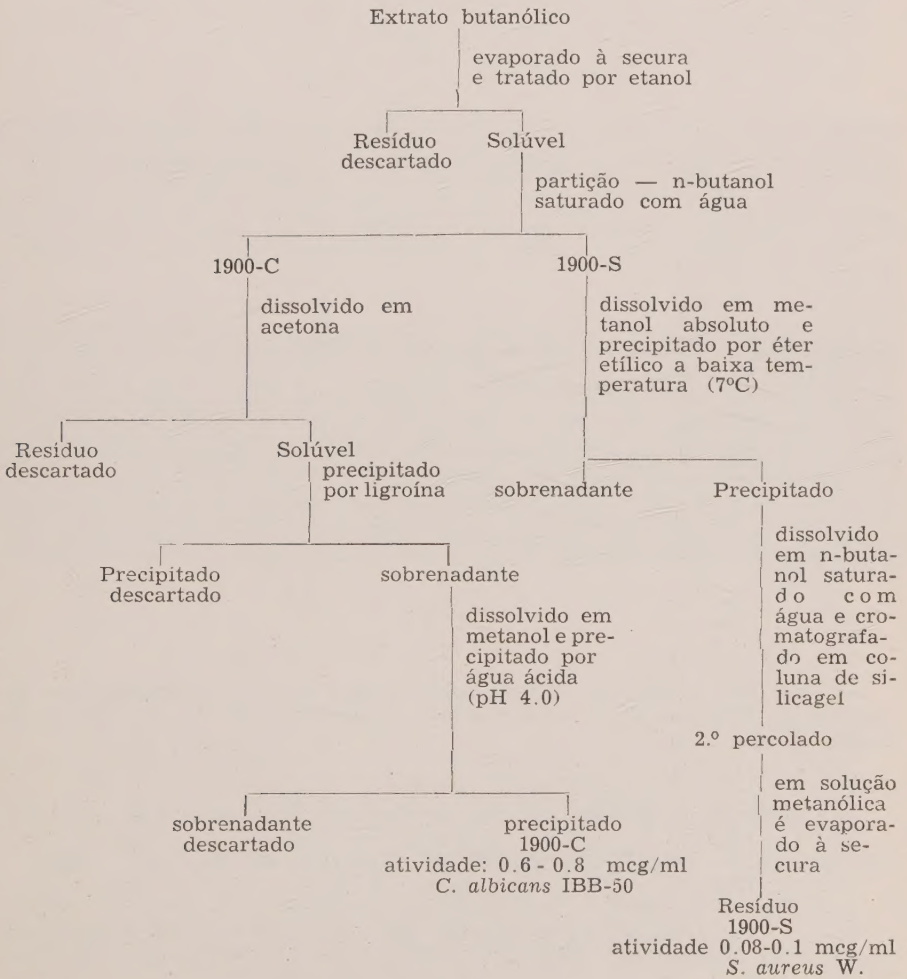
que depois de sêca e posteriormente dissolvida em metanol absoluto, é evaporada à secura, resultando numa substância amorfa de côr marrom café.

A fração 1900-C é dissolvida em acetona, descartando-se o resíduo. A solução é precipitada por ligroína, e o sobrenadante depois de sêco é redissolvido em metancl e precipitado por água ácida (pH 4.0). O precipitado assim obtido é caracterizado por seu campo de ação antagonista.

O quadro I corresponde ao esquema de isolamento e purificação dos antibióticos citados.

QUADRO I

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS 1900-S E 1900-C

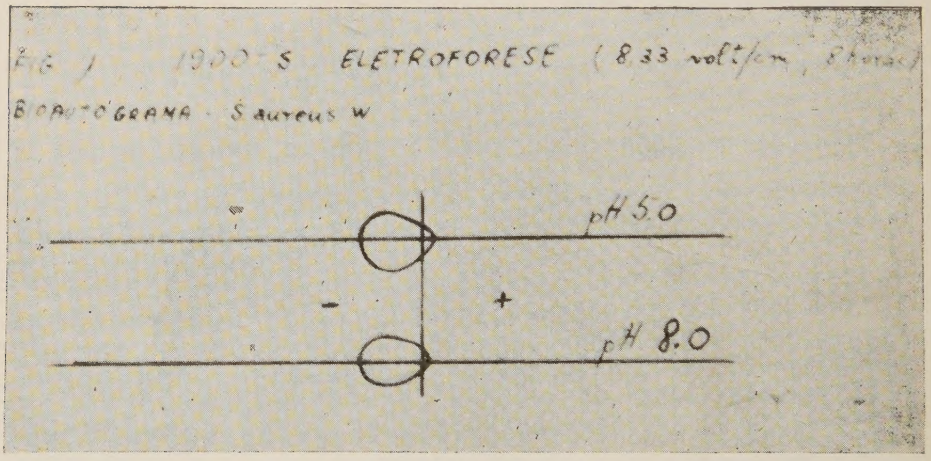


PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

1900-S — Na forma obtida, se apresenta como uma substância amorfa de côr marrom café, solúvel em água, metanol, etanol, propanol, ácido acético glacial, piridina e álcool amílico; dificilmente solúvel em acetona e butanol e insolúvel em ligroína, clorofórmio, benzeno e acetato de etila.

Resultaram negativas as reações químicas: maltol, ninhidrina, glucosamina, Sakaguchi, Fehling, Benedict e os testes para Carbomicina e Eritromicina, segundo Grove & Randall (1955); a reação de Molisch apresenta resultado positivo muito lento, e a de Tollens dá abundante precipitado quando submetida a aquecimento. Muda a côr do permanganato para vermelho cereja, e frente ao ácido sulfúrico toma coloração amarelo castanho.

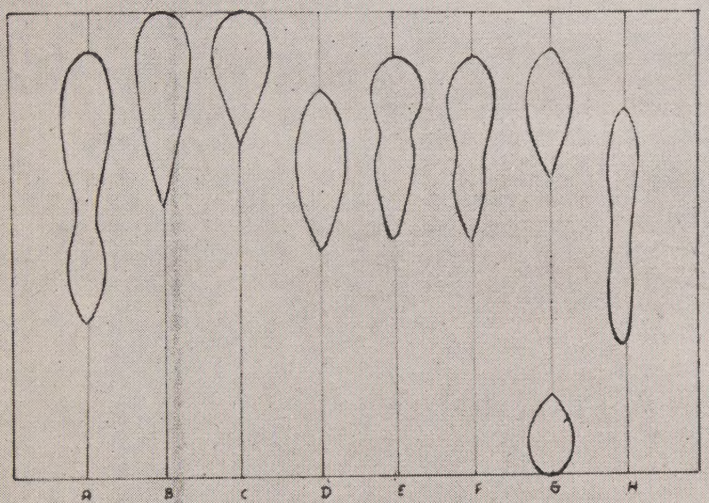
A eletroforese (8,33 volt/cm, 8 horas) realizada em tampão de fosfato nos pH 5.0 e 8.0, mostra tendência de caráter básico para a substância. (Fig. 1).



As figs. 2 e 3 indicam os resultados obtidos com os cromatogramas sumários de Ishida e série de solventes (modificação de O. Gonçalves de Lima, 1959).

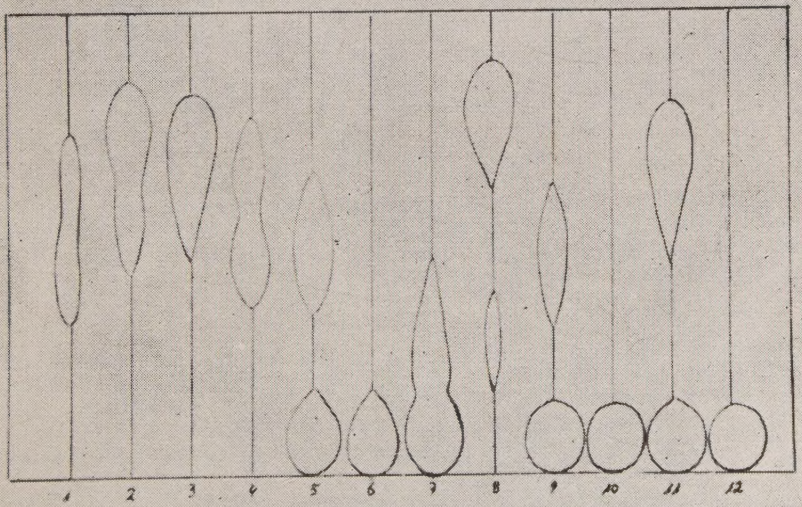
O espectro de absorção à luz ultravioleta apresentou três máximos: 210 mu ($E^{1\%}_{1cm}$ 1.410); 220 mu ($E^{1\%}_{1cm}$ 1.145); e 263 mu ($E^{1\%}_{1cm}$ 201) em solução metanólica. (Fig. 4).

FIG 2 1900-S CROMATOGRAMA SUMÁRIO ISHIDA (BIORUTOGRAMA - S. AUREUS W)

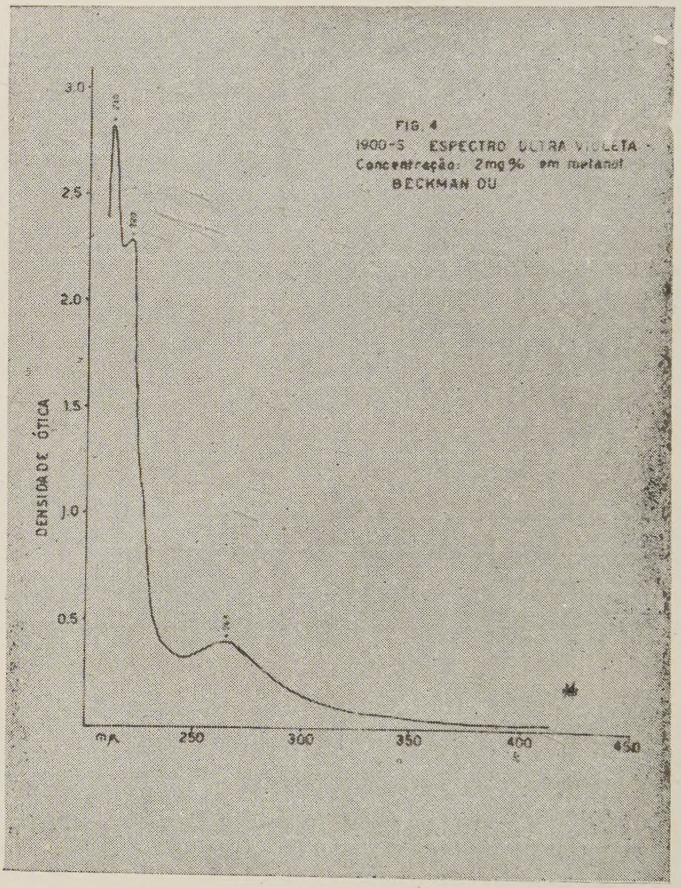


A (butanol saturado) - B (Cl NH4 20%) - C (fenol saturado) - D (acetona 50%)
E (butanol 40, metanol 10, água 20, metiloranje 1,5g) - F (butanol 40, metanol 10, água 20).
G (benzeno 80, metanol 20) - H (água).

FIG 3 1900-S CROMATOGRAMA SUMÁRIO - SERIE DE SOLVENTES (BIORUTOGRAMA - S. AUREUS W).



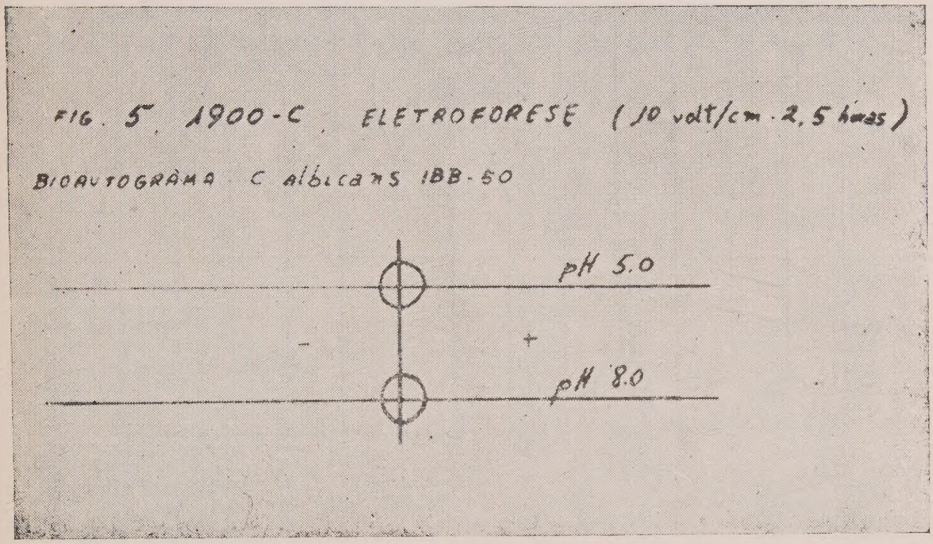
1 (água) 2 (Cl NH4 3%) - 3 (tampão fosfato pH 8,0) - 4 (sol. ac. pícrico sat.)
5 (metanol) - 6 (acetona) - 7 (acetato de etila) - 8 (butanol sat.) 9 (éter etílico sat).
10 (clorofórmio) 11 (benzeno) - 12 (ligroina)

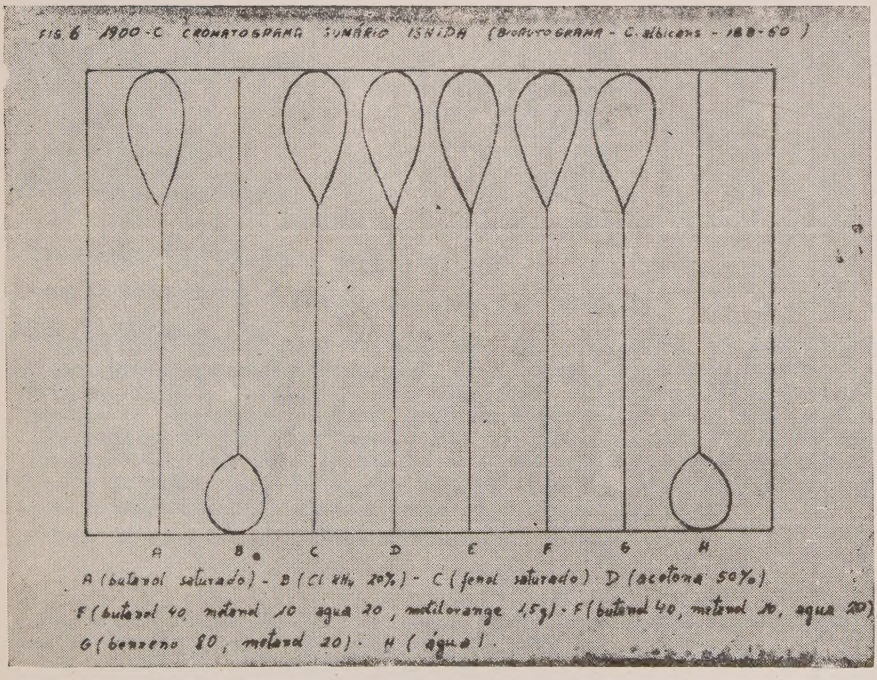


1900-C — Substância amorfa de côr marrom, é insolúvel em água, ligroína e éter etílico; solúvel em acetona, metanol, butanol, acetato de etila, álcool propílico, ácido acético glacial, piridina e álcool amílico. É muito pouco solúvel em clorofórmio, benzeno e tetracloreto de carbono.

São negativas as reações químicas para maltol, ninhidrina, glucosamina, Sakaguchi, Fehling e Benedict. A reação de Molish apresentou anel de côr verde, e a de Tollens, sòmente quando submetida a aquecimento, precipitou. O permanganato mudou a côr para vermelho cereja, e em excesso formou abundante precipitado. O ácido sulfúrico concentrado dá uma coloração marron avermelhada.

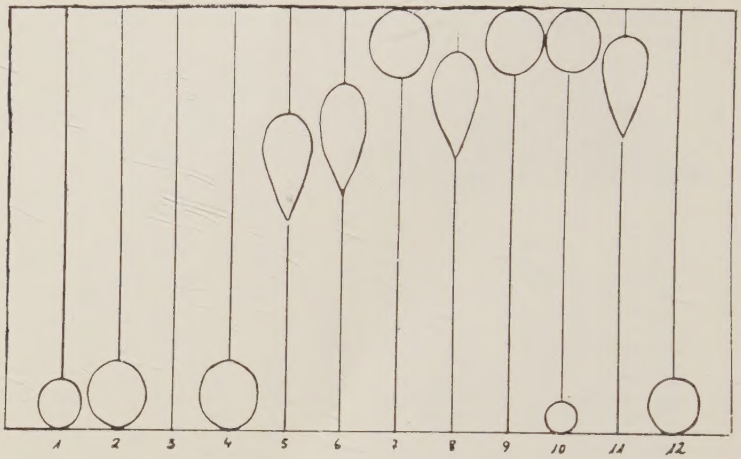
As eletroforeses nas condições de 10 volt/cm, 2,5 horas, em tampão de fosfato nos pH ácido e alcalino identificam uma substância de caráter anfótero. (Fig. 5).





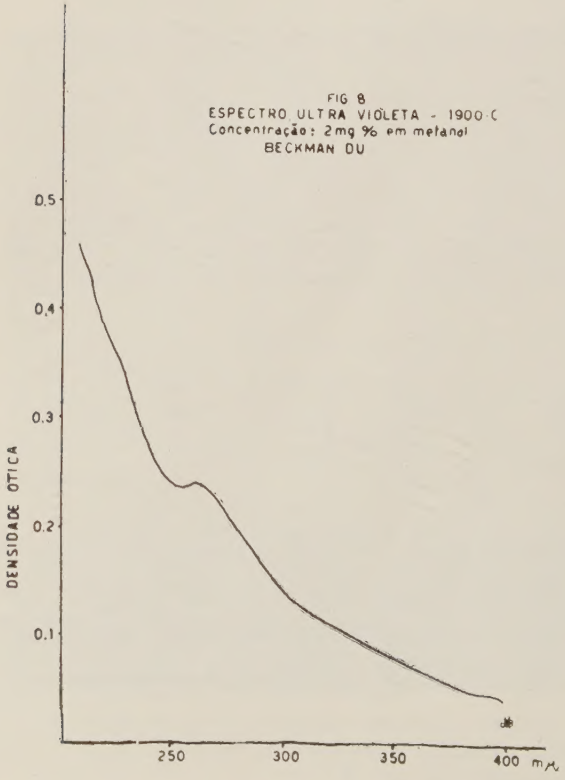
Os cromatogramas sumários de Ishida e com a série de solventes são apresentados nas figs. 6 e 7.

FIG 7 1900-C CROMATOGRAMA SUMÁRIO SÉRIE DE SOLVENTES (BIOAUTOGRAMA C. ALICANS ATCC)



1 (água) - 2 (Cl NH₄ 3%) - 3 (tampão fosfato pH 8.0) - 4 (sol. ac. pícrico sat.)
5 (metanol) - 6 (acetona) - 7 (acetato de etila) - 8 (butanol sat.) - 9 (éter etílico sat.)
10 (clorofórmio) - 11 (benzeno) - 12 (ligroína)

FIG 8
ESPECTRO ULTRA VIOLETA - 1900 C
Concentração: 2mg % em metanol
BECKMAN DU



O espectro de absorção à luz ultravioleta, em solução metanólica, apresenta apenas um máximo em 259mμ ($E^{1cm}_{1\%}$ 130 Fig. 8)

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

As atividades das substâncias 1900-S e 1900-C, determinadas pelo método de diluição (Waksman & Reilly, 1945) são expressas no quadro II.

QUADRO II

MICRORGANISMOS	mcg/ml	
	1900-S	1900-C
Bacillus subtilis 9	2,0 — 4,0	80,0 — 100,0
Bacillus mycoides	30,0 — 40,0	> 100.0
Bacillus anthracis	6,0 — 8,0	30,0 — 40,0
Staphylococcus aureus	0,08 — 0,1	50,0 — 100,0
Streptococcus hemolyticus	1,0 — 2,0	50,0 — 100,0
Sarcina lutea	0,08 — 0,1	30,0 — 40,0
Escherichia coli N	10,0 — 15,0	> 100.0
Shigella paradysenteriae	5,0 — 10,0	> 100.0
Salmonella typhosa	5,0 — 10,0	> 100.0
Klebsiella pneumoniae	5,0 — 10,0	100,0
Brucella melitensis	1,0 — 2,0	50,0 — 100,0
Brucella abortus	2,0 — 4,0	50,0 — 100,0
Neisseria catarrhalis	4,0 — 6,0	50,0 — 100,0
Proteus vulgaris	10,0 — 15,0	> 100.0
Proteus mirabilis	6,0 — 8,0	> 100.0
Pseudomonas aeruginosa	> 100.0	> 100.0
Nocardia asteroides	5,0 — 10,0	30,0 — 40,0
Mycobacterium tub. var. *hominis*	80,0 — 100,0	40,0 — 60,0(*)
Mycobacterium phlei	80,0 — 100,0	60,0 — 80,0(*)
Mycobacterium smegmatis	60,0 — 80,0	60,0 — 80,0(*)
Candida albicans	> 100.0	0,8 — 1.0
Candida kruzei	> 100.0	8.0 — 10,0
Candida parakruzei	> 100.0	15,0 — 20,0
Candida tropicalis	80,0 — 100.0	0,5 — 0,5
Candida stellatoidea	60,0 — 80,0	0,5 — 0,6
Cryptococcus neoformans	> 100.0	1,0 — 2.0

(*) Colônias de resistência desde 100,0 mcg/ml.

TESTES DE TOXIDEZ AGUDA

Antibiótico 1900-S. Foi testado por via subcutânea em camundongos suíços albinos nas doses de 600, 250, 100 e 50 mg/kg de pêso corporal e observados durante 15 dias, ao fim dos quais foram recolhidos ao biotério sem que se observasse qualquer modificação no estado geral dos mesmos.

Antibiótico 1900-C. Foi testado por via intraperitonial em camundongos suíços albinos, suspenso em Tween 80 a 5%, em sôro fisiológico nas doses de 400, 300, 250, 100 e 50 mg/kg de pêso corporal, apresentando um resultado aproximado LD_{50} situado entre 70 e 100 mg/kg pêso.

Nota: Foram testados 4 animais em cada grupo.

RESUMÉ

Une étude générale sur deux substances antibiotiques, 1900-S et 1900-C produites par un *Streptomyces*, souche 1900-IAUR est presentée.

Les antibiotiques sont différents à cause ses activités antagonistes: la substance 1900-S est active pour les microrganismes Gram-positifs et Gram-negatifs, et 1900-C, substance avec activité pour champignons levuriforms. Nous avons observé cette particularité pendant la première phase de la purification (partage avec n-butanol saturé avec de l'eau).

SUMMARY

A general study concerning two antibiotic substances 1900-S and 1900-C produced by *Streptomyces* strain 1900-IAUR is presented.

The two antibiotics differ in their activities: the substance 1900-S is active against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. The substance 1900-C shows activity against yeast-like fungi.

These observations have been made in the initial phase of purification. Both substances were separated by means of butanol saturated with water.

ZÜSAMMENFASSUNG

Wir legen ein allgemeines Studium ueber zwei antibiotische Substanzen 1900-S und 1900-C vor, welche von einem *Streptomyces*, Stamm 1900-IAUR, erzeugt werden.

Die Antibiotika zeichnen sieh duroh ihre antagonistiche Aktivitaet aus: 1900-S ist wirksam gegen Grampositive und Gramnegative und 1900-C, ist eine Substanz mit Wirkung gegen helefoermige Pilze, wobei diesse Eigenschaft in der Anfangsphase der Reinigung beobachtet wird (Verteilung mit wassergesaettigtem n-Butylalkohol).

STRESZCZENIE

Przedstawiono ogólne spostrezezenia dotyczace dwu antybiotycznych substancji wytwarzanych przez szczep promieniowa *Streptomyces sp* 1900-IAUR.

Obydwa antybiotyki róznia sie swymi wlasciowosciami antagonistycznymi: substancja 1900-S dziata antybiotycznie na drobnoustroje Gram-dodatnie y Gram-ujemne. Substancja 1900-C hamuje wzrost drozdzy.

Spostrzezenia powyzsze dotycza pierwszej fazy oczyszczania antybiotyku. Obydwie substancje rozdzielono zapomoca n-butanolu nasyconego woda.

REFERÊNCIAS

GONÇALVES DE LIMA, O., *et al.*, Ocorrência de antibióticos em madeiras-de-lei do Brasil. *Rev. Antib. Univ. Recife*, vol. 2 ns. 1 e 2; 19-51 (1959).

GROVE, DONALD C. & RANDALL, WILLIAM., Assay methods of antibiotics; a laboratory manual. New York, *Medical Encyclopedia Inc.*, 148 (1955).

PRIDHAM, T. G. *et alii*, A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. *Applied Microbiology* Baltimore, 6 (1): 52-79, Jan. 1958.

WAKSMAN, S. A. & REILLY, H. C., Agar streak Method; *Ind. Eng. Chem Analyt.* Ed. A: 556 (1945).

Francisco Décio de Andrade Lyra, Marisa Machado F. de Albuquerque, O. Gonçalves de Lima, Maria Helena Dália Maia, Gessé M. Maciel

1) Dois Antibióticos Antifúngicos Isolados de Micélio de um *Streptomyces sp.* (Cêpa 1645 — IAUR) — Primeiros Informes

No decurso dos nossos trabalhos de busca de *Streptomyces* antagonistas, foi selecionada a cêpa 1645 com forte atividade antifúngica de cujo micélio foram isolados dois antibióticos com características bem distintas, ambos com notável atividade anti-*Candida*.

São descritos no presente trabalho alguns dados sumários sôbre as características taxonômicas da cêpa IAUR-1645, bem como os métodos de isolamento e purificação de cada um dos antimicrobianos e seus respectivos espectros antibióticos, assim como os papirogramas sumários de ambas as substâncias.

CARACTERIZAÇÃO DA CÊPA 1645

Morfologia: hifas curtas ligeiramente enroscadas monopodiais; secção RF tendendo para RA (segundo Pridham *et al.*, 1958); esporos globosos a ovais.

Micélio aéreo: em quase todos os meios é creme acinzentado a ocre (9B1 a 9B2-9D2 Maerz & Paul, 1950) apresentando manchas na superfície do micélio. Em GA o micélio é creme-esverdeado. Em AN não há formação de micélio aéreo.

Micélio vegetativo: incolor (observ. às 48 h) em quase todos os meios (Cz, ML, GA, BGA, Asp. glicose, AN).

O reverso das culturas é verde-amarelo, tornando-se verde-castanho (11J3).

O pigmento não se difunde nos substratos.

Gelatina : só houve crescimento após adição de caldo glicosado ao meio de gelatina peptona usual. Desenvolvimento abundante, em anel; reverso creme a esverdeado, micélio aéreo branco-sujo. Pigmento solúvel não produzido.

Liquefação rápida (total ao 10.º dia).

Leite: desenvolvimento incolor, em película. Micélio aéreo ausente ou cinza claro. Pigmento solúvel não produzido. Leve alcalinização. Peptonização (100% aos 75 dias).

Amido: hidrólise forte.

Nitrato: Redução fraca em meio sintético (amido-nitrato); nenhuma redução em meio complexo (Indol-nitrito, BBL).

Celulose: Não cresceu.

Batata: Micélio aéreo creme-cinza, micélio vegetativo elevado, dobrado.

Reverso marrom a amarelo-castanho. Ligeiro escurecimento do meio. Assimilação de carbono:

Salicina	*
Xilose	*
Manitol	(*)
Ramnose	—
Sacarose	—
Rafinose	?

* positiva
(*) positiva fraca
— negativa

(Antagonismo: Produz dois antibióticos antifúngicos, extraídos de micélio).

PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DOS ANTIBIÓTICOS

Utilizou-se na produção dos antibióticos, em cultivo agitado, o meio selecionado entre os mais comumente usados por nós, a base de soja, assim constituído:

Glicose	10 g
Farinha de soja	10 g
Carbonato de cálcio	1 g
Cloreto de sódio	5 g
Água destilada	1000 ml

Como inóculo, foi utilizada suspensão de esporos provenientes tanto do meio Czapek a meia concentração salina, como do meio L (Extrato de levedura-extrato de malte-agar).

A extração das substâncias antibióticas fêz-se por agitação do micélio com metanol durante três horas, na proporção de 1:5 (p/v). Tal extrato metanólico assim obtido do micélio serviu para uma apreciação do seu comportamento papirográfico em um cromatograma sumário com os solventes abaixo mencionados (modificação de Gonçalves de Lima), que pareceu revelar a presença das duas substâncias ativas (fig. 1).

1. Água destilada
2. Cloreto de amônio a 3%
3. Tampão pH 7.9 — 8.0
4. Solução saturada de ácido pícrico
5. Metanol 96%
6. Acetona
7. Acetato de etila saturado com água
8. n-Butanol saturado com água
9. Éter etílico saturado com água
10. Clorofórmio
11. Benzeno
12. Éter de petróleo.

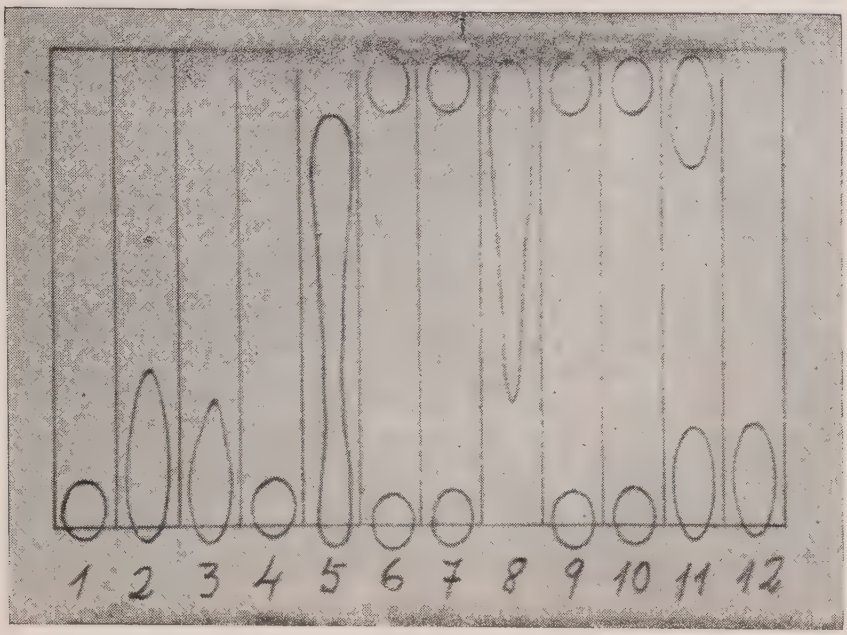


FIG. 1
Cromatograma sumário do extrato metanólico do micélio

O extrato metanólico é evaporado à secura e tratado por etanol absoluto obtendo-se duas frações.

(1) A fração insolúvel é tratada repetidas vêzes por etanol absoluto até que o solvente se apresente incolor. O resíduo, então um pó amarelo claro, é sêco e em seguida submetido ao tratamento por água várias vêzes, descartando-se a fração aquosa de côr parda escura (amarelo sujo). O insolúvel, amorfo de côr amarelo-ouro e atividade 0.08 — 0.1 mcg/ml contra *Candida albicans* (em meio de agar nutritivo), denominamos 1645-P_1.

(2) A segunda fração solúvel em etanol absoluto, é evaporada a xarope e tratada por etanol absoluto (descartando-se o resíduo), precipitando-se o sobrenadante por acetona, permanecendo o princípio ativo na solução que é evaporada à secura. Dissolve-se o resíduo em etanol absoluto e trata-se por ligroína. O sobrenadante então obtido (1645-AL_1) é levado a duas partições consecutivas no sistema heptano/etanol 80% (1/1), originando a substância ativa 1645-8H, que posteriormente tratada por água dá uma fração solúvel inativa e um resíduo (1645-P_2), o qual depois de sêco apresenta-se amorfo, pardo claro, com atividade anti-*Candida albicans* de 0.08 — 0.1 mcg/ml (em agar nutritivo).

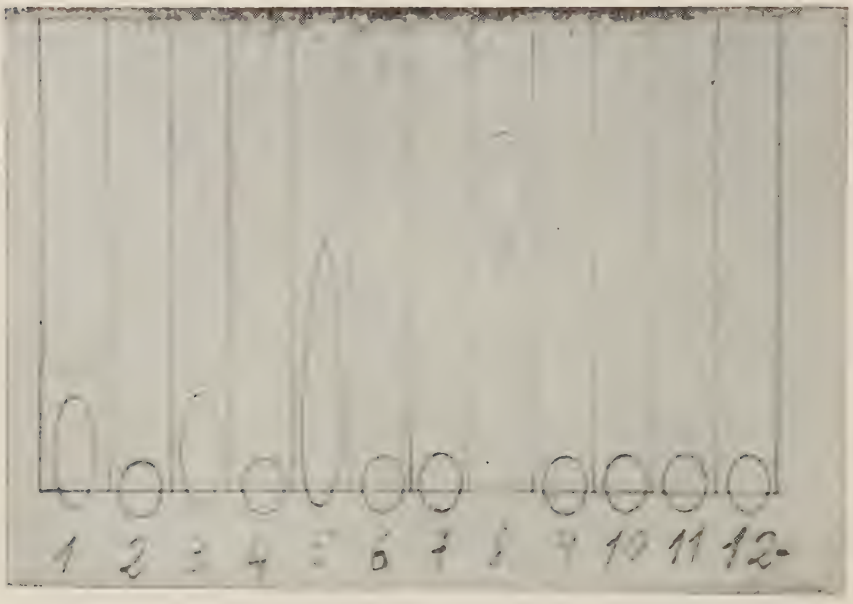


FIG. 2

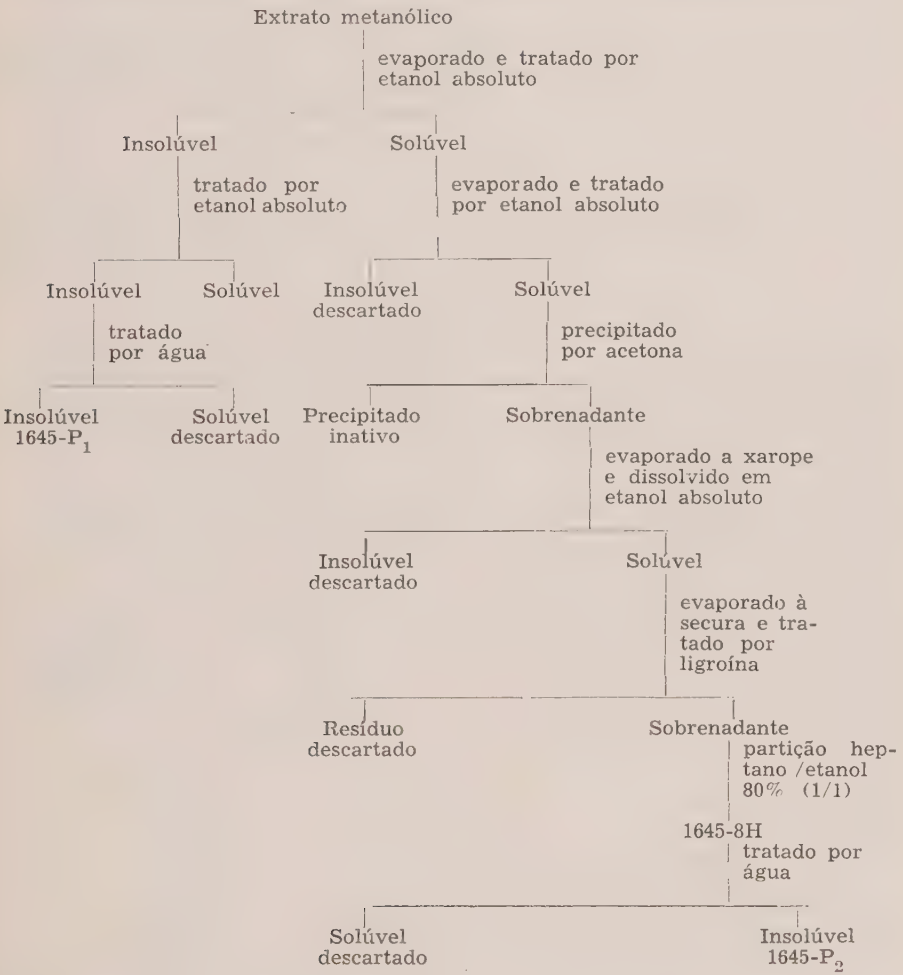
Cromatograma sumário da substância 1645-P,

FIG. 3

Cromatograma sumário da substância 1645-P_2

Damos a seguir o esquema de purificação dos antibióticos referidos.

ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS 1645-P_1 E 1645-P_2



Realizamos, então, cromatogramas sumários nos mesmos sistemas anteriormente referidos, utilizando as duas substâncias isoladas 1645-P_1 e 1645-P_2 (figs. 2 e 3).

As substâncias P_1 e P_2 são muito ativas contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* apresentando também atividade contra fungos filamentosos e nenhuma atividade para bactérias tanto Gram-positivas

como Gram-negativas. Igualmente não apresentam qualquer inibição contra *Nocardia asteroides*. Os resultados sôbre as suas ações antimicrobianas estão expressos no quadro I.

QUADRO I

Espectro antimicrobiano *in vitro* dos antibióticos 1645-P_1 e 1645-P_2

MICRORGANISMOS	mcg/ml			
	1645-P_1		1645-P_2	
	Meio AN	Meio MC	Meio AN	Meio MC
Candida albicans IBB-50	0,08-0,1	0,2- 0,4	0,08-0,1	3,0- 4,0
Candida albicans IHM-582	0,08-0,1	0,1- 0,2	0,08-0,1	3,0- 4,0
Candida kruzei IBB-42	0,08-0,1	0,1- 0,2	0,06-0,08	3,0- 4,0
Candida parakruzei IBB-48	0,08-0,1	0,2- 0,4	3,0 -4,0	>10,0
Candida tropicalis IBB-47	0,1 -0,2	0,4- 0,6	4,0 -6,0	>10,0
Candida pseudotropicalis IBB-49	0,08-0,1	0,5- 0,6	4,0 -6,0	7,5-10,0
Candida stellatoidea IBB-45	0,06-0,08	0,2- 0,4	0,06-0,08	1,0- 2,0
Criptococcus neoformans ENCB	0,08-0,1	0,1- 0,2	0,2 -0,4	6,0- 8,0
Saccharomyces cerevisiae CBS	0,1 -0,2	0,2- 0,4	0,2 -0,4	6,0- 8,0
Aspergillus niger IMUR-19		<1,0		5,0 10,0
Aspergillus niger ATCC-1015		10,0-15,0		40,0-60,0
Aspergillus flavus-oryzae ATCC-9362		>100,0		
Aspergillus terreus IMUR-13		<1,0		
Penicillium lilacinum Mass. 4e		>100,0		
Penicillium charlesii Mass. 6838		>100,0		
Trichophyton tonsurans IMUR-450		10,0-20,0		60,0-80,0
Geotrichum candidum IMUR-105		<1,0		>100,0
Mucor oblongisporus Mass. 776		<1,0		60,0-80,0
Coccidioides immitis IMUR-533		5,0-10,0		>100,0
Cladosporium fulvum IMUR-44		<1,0		
Trichoderma lignorum IMUR-266		10,0-15,0		
Phialophora pedrosoi IMUR-620		<1,0		
Bacillus subtilis 9	>100,0		>100,0	
Staphylococcus aureus	>100,0		>100,0	
Sarcina lutea	>100,0		>100,0	
Streptococcus hemolyticus	>100,0		>100,0	
Neisseria catarrhalis	>100,0		>100,0	
Escherichia coli N	>100,0		>100,0	
Brucella melitensis	>100,0		>100,0	
Mycobacterium tub. var. *hominis*	>100,0		>100,0	
Mycobacterium phlei	>100,0		>100,0	
Mycobacterium smegmatis	>100,0		>100,0	
Nocardia asteroides	>100,0		>100,0	

Foram usados os meios AN e MC de seguintes composições:

Meio AN — Extrato de carne, 3g; Peptona, 10 g; ClNa, 5 g; Agar, 20 g; Água destilada, 1000 ml; pH 7.0 — pH 7.2.

Meio MC — Bacto triptona, 5 g; Extrato de malte, 3 g; Glicose (Karo), 10 g; Extrato de levedura, 3 g; Agar, 15 g; Água destilada, 1000 ml; pH 7.0.

RÉSUMÉ

Cet article donne les caracteristiques taxonomiques de *Streptomyces* IAUR-1645, qui produit deux substances antibiotiques ayant une forte activité antifungique. Les méthodes d'isolement et de purification, les chromatogrames summaires sur papier et le spectre antibiotique des deux substances sont décrites en détail.

SUMMARY

This paper presents data about the taxonomical characteristics of a *Streptomyces sp.* strain IAUR-1645, with a strong antifungal activity. The methods of isolation and purification, the summaric papergramms and the antibiotic spectra of both substances are described in detail.

ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit werden einige taxonomische Angaben eines *Streptomyces*-Stammes-1645-IAUR vorgelegt, welcher Erzeuger von zwei stark antimykotischen Substanzen ist. Die Isolierungs und Reinigungsmethoden jeder dez zwei antimikrobiellen Substanzen und ihre diesbezuegliche antibiotische Wirksamkeit sowie ihre zusammenfassenden Papierchromatogramme sind desgleichen beschrieben.

STRESZCZENIE

Praca podaje dane o wlásciwosciach taksonomicznych szczepu *Streptomyces* sp IAUR-1645, który wytwarza dwie antybiotyczne substancje o silnym dzialaniu przeciwgrzbowym. Praca zawiera dokladny opis metod izolacji i oczyszczania antybiotyku, wyniki chromatografii sumarycznej oraz spectra antybiotyczne obydwu substancji.

REFERÊNCIAS

GONÇALVES DE LIMA, O.: *Rev. Inst. Antib.* 1959, ns. 1 e 2. 19.33. Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores. Comunicação XIV. Ocorrência de Antibióticos em Madeiras-De-Lei do Brasil.

MAERZ, A. & REA PAUL: *A Dictionary of Color*, 2a. Ed. Mc Graw-Hill Book Co., (1950).

PRIDHAM, T. G., C. W. HERSELTINE & R. G. BENEDICT: *Appl. Microb.*, 1958. 6 52-79.

Evans Silva

Primeiras observações sôbre o Sarcoma IAUR — 1.

São apresentadas as primeiras observações sôbre um novo tumor transplantável em ratos Wistar e Sprague Dawley, aparecido expontaneamente em um rato macho Wistar da colônia do I.A.U.R. O *Sarcoma I.A.U.R.- — 1 —* apresenta características histológicas fibrossarcomatosas e tem um índice de "pega" de pràticamente 100%.

Uma revisão histórica de 50 tumores transmissíveis e transplantáveis de animais contendo descrições pormenorizadas de suas origens, aspectos histológicos e outras características foi publicada recentemente (*Stewart, Snell, Dunham e Schlyen,* 1959).

Entre os 50 tumores apresentados verifica-se que apenas um é classificado como fibrossarcoma — *Fibrossarcoma L de Earle* — derivado de um fragmento de tecido subcutâneo de camundongo C3H, mantido em cultura de tecido à qual havia sido adicionado 20-Metil-colantreno.

No presente trabalho são relatadas as primeiras observações sôbre um tumor transplantável aparecido expontaneâmente em um rato macho Wistar da colônia do I.A.U.R., preliminarmente identificado histològicamente como fibrossarcoma.

HISTÓRICO E DESCRIÇÃO DO TUMOR ORIGINAL

Em 25.09.59 constatámos acidentalmente na colônia do I.A.U.R. (*) em um rato macho Wistar com idade superior a um ano e quatro meses, um tumor do tamanho aproximado de um ôvo de galinha, localizado na região torácica. À apalpação apresentava consistência dura e discreta aderência aos planos superficiais.

Aberta a pele com o animal sob anestesia etérea e com precauções assépticas visualisamos um tumor encapsulado, não aderente aos planos profundos e com escassa vascularização periférica. Ao córte, consistência dura, aspecto esbranquiçado brilhante, vascularização pràticamente ausente e necrose mais ou menos centralizada evidenciável por uma menor resistência ao córte e coloração amarelo-pálida.

Após separação cuidadosa da cápsula que o envolvia, foram retirados fragmentos da parte periférica, os quais depois de uniformizados em tamanho, foram implantados pela técnica habitual do trocarte na cauda de 5 ratos machos Wistar e no tecido subcutâneo correspondente a omoplata esquerda de mais 5 ratos machos da mesma cêpa. Também foram retirados fragmentos para estudo histológico, os quais em seguida à fixação

(*) — Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife.

pelo formol a 10%, foram corados pela hemotoxilina-eosina, Van Gieson e hematoxilina fósfo-túngstica.

Ao exame microscópico o material apresentou-se formado por grupos de células dispostas compactamente assumindo aparência organular ou colunar, caracterizados por células de contornos indefinidos, núcleos grandes vesiculosos, redondos ou elipticos com cromatina arranjada frouxamente, um ou mais nucléolos e figuras de mitose frequentes. Entre os grupos celulares citados, encontram-se células alongadas, com núcleos de extremidades afiladas, hipercromáticos. Estas células apresentam-se agrupadas sob a forma de feixes cercando os grupos organulares antes citados e não apresentam mitóses. Em alguns trêchos do córte são visualisadas células com forma de transição com as anteriormente descritas (*fotomicrografias* 1, 2 e 3).

As coloração pelo Van Gieson e pela hematoxilina fósfo-tungstica mostram uma moderada colagenização dos feixes de células alongada. Em algumas observa-se a ocorrência de material hematoxinófilo granular, parecendo fragmentos de núcleos livres ou fagocitados. De um modo geral o tumor apresenta-se pouco vascularizado (*fotomicrografias* 4 e 5).

ESTUDOS DE TRANSPLANTABILIDADE

O primeiro transplante como referido anteriormente foi feito para 10 ratos machos Wistar de nossa colônia, sendo que 5 animais foram implantados na cauda e os 5 restantes no tecido subcutâneo correspondente a omoplata esquerda, pela técnica do trocarte. Os fragmentos implantados haviam sido excisados com a maior assepsia possível e colocados em placa de Petri contendo sôro fisiológico e Penicilina G potássica cristalina na concentração de 1.000 unidades por ml. Os fragmentos implantados no tecido subcutâneo da omoplata mediam aproximadamente 3 mm. de tamanho e os implantados na cauda cêrca de 1mm.

Vinte e sete dias após os resultados eram os seguintes entre os animais implantados na região da omoplata esquerda: 1 "pega" negativa; 1 "pega" positiva com rompimento da pele e morte do animal; 3 "pegas" temporárias em franca regressão, o que nos dá um total de apenas 20% de "pegas" positivas. De um dos animais cujo tumor estava em regressão foram retirados fragmentos e feito transplantes pela técnica do trocarte para 6 ratos machos Wistar, na região da omoplata esquerda. Em todos êsses animais os fragmentos tumorais foram totalmente absorvidos.

Trinta e seis dias após, entre os 5 animais implantados na cauda, 2 já haviam morrido por rompimento da pele e infecção. Dos 3 animais restantes nos quais os tumores continuavam crescendo bem e sem indícios de regressão, foram retirados fragmentos e implantados com precauções asséptica para a região da omoplata esquerda de 5 ratos machos Wistar (2a. passagem). Desde esta época até os dias atuais o tumor vem sendo mantido com a técnica do trocarte na região correspondente a omoplata esquerda.

Até a 14.ª passagem o tumor foi transplantado com intervalos de tempo que variavam de 9 a 12 dias em animais da cepa Wistar. Da 15.ª a 24.ª passagem o tumor foi mantido em ratos de cêpa Sprague Dawley sendo os

transplantes efetuados com intervalos de tempo variáveis de até 40 dias sem prejuízo da percentagem de "pegas" positivas. Da 22.ª passagem até a passagem atual (44.ª passagem) o tumor vem sendo implantado indiferentemente em animais Wistar ou Sprague Dawley de acôrdo com as disponibilidades do nosso biotério.

Observou-se também que o tumor cresce indiferentemente em animais jovens ou velhos assim como em animais fêmeas de ambas as cêpas e em ratos das mesmas cêpas nos quais haviam falhado sucessivos implantes de Carcinosarcoma de Walker 256.

Não foi verificada a possibilidade do tumor crescer em ratos de quaisquer outras linhagens.

Atualmente o tumor encontra-se na 44.ª passagem com pràticamente 100% de "pegas" positivas, matando os animais com um promédio de 50 dias, sendo os transplantes efetuados com intervalo de 14 dias.

ESTUDOS HISTOLÓGICOS (*)

Não foi feito estudo histológico do material resultante da implantação em cauda e que constituiu a 1.ª passagem da qual em linha direta provieram tôdas as passagens subsequentes até a atual.

O exame histológico do material transplantado que a partir da cauda cresceu na região correspondente a omoplata de ratos Wistar — 2.ª passagem — apresenta-nos um padrão histológico diferente do apresentado pelo tumor original, pois os dois tipos de células descritas anteriormente como organizadas em disposição organular de células arredondadas com figuras de mitoses frequentes cercadas por feixes de células alongadas com núcleos igualmente alongados e sem figuras de mitose, se nos apresenta agora com os mesmos tipos celulares misturados difusamente com quase total predominância das células alongadas. Verifica-se também, atipia mínima, sendo escassas as figuras de mitóse e existindo extensas áreas com aparência mixomatosa (*fotomicrografias* 6, 7 e 8).

O estudo histológico das demais passagens até a atual nos apresentam um tumor com aparência essencialmente idêntica a acima descrita, a não ser variações tais como predominância de aspecto mixomatôso em córtes de algumas passagens (*fotomicrografia* 9) e de aspecto neurofibromatoso em outras (*fotomicrografia* 10).

Visando esclarecer se estas variações eram consequências de processos evolutivos do tumor através de sucessivas passagens, vários ratos que receberam a 26.ª passagem tiveram seus tumores excisados em bloco, 7, 10, 14, 23 e 26 dias após o implante sendo em seguida submetidos a acurado exame histológico.

Inferiu-se da comparação entre as características apresentadas por êsses materiais e as variações verificadas em diferentes passagens, que os diversos aspectos histológicos encontrados no decorrer das diversas pas-

(*) Nossos agradecimentos ao Prof. Adonis Carvalho da Faculdade de Medicina da U. R. pela integral colaboração prestada nos estudos histológicos.

sagens deviam-se apenas a idade do tumor que cedeu a amostra ou a retirada de fragmentos de locais diversos de um tumor com a mesma idade.

No decorrer do estudo histológico das diversas passagens foi verificado por vêzes atividade invasiva do tumor frente a tecidos adiposo a muscular (*fotomicrografias* 11 e 12).

DISCUSSÃO

O baixo índice de "pega" nas primeiras passagens a partir de um tumor "expontâneo" ou "provocado" assim como um aumento gradual do "índice de pega" através de sucessivos transplantes é um fato estabelecido.

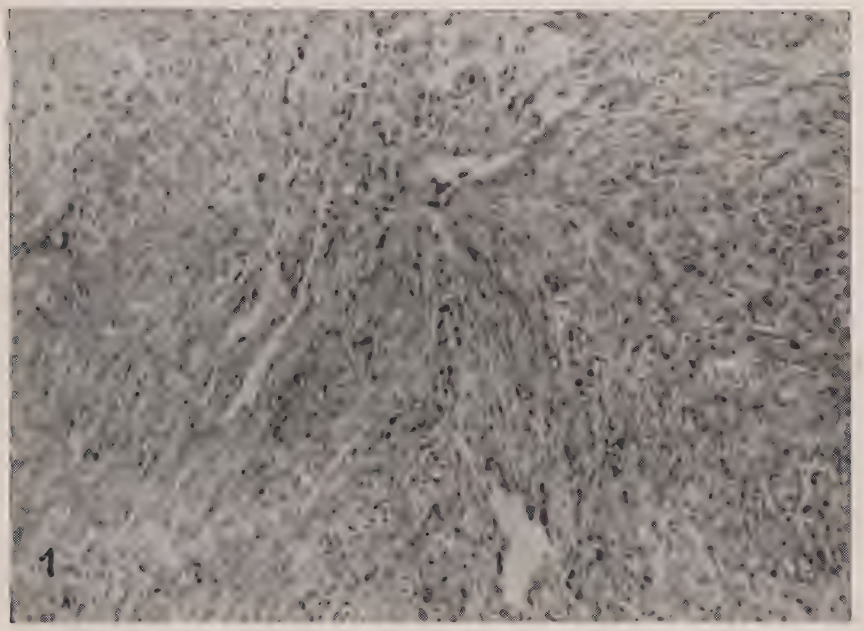
No caso do Fibrossarcoma em estudo verificamos na 1.ª passagem que enquanto o índice de "pega" foi de apenas 20% nos animais implantados no tecido subcutâneo correspondente a região da omoplata, o índice de "pega" dos animais implantados na cauda foi de 100%.

Embora baseados nesta única observação sem valor estatísticamente significativo os autores sugerem que a passagem em cauda possibilitou, por razões não ainda totalmente esclarecidas, um melhor índice de "pega".

Outro fato que nos leva a crer que a cauda como sítio de transplante tem uma ação favorável sôbre o índice de "pega", foi a constatação de um pràticamente completo índice de "pega" desde a 2.ª passagem do recente tumor, após a passagem em cauda.

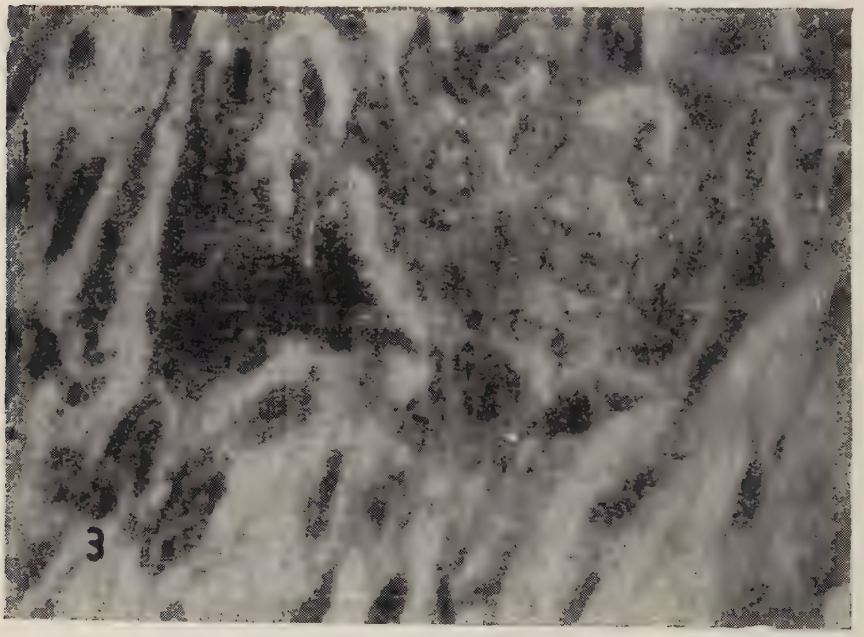
Quanto às diferenças de padrão histológico existentes entre o tumor original e os tumores das subsequentes passagens, trata-se de uma ocorrência bastante frequente nos tumores transplantáveis sendo mais infrequente a manutenção através de sucessivas passagens de um mesmo padrão histológico.

A não existência da variabilidade no quadro histológico a partir dos animais que receberam implantes que haviam crescido na cauda até o momento atual (44.ª passagem) nos apresenta um tumor fibrossarcomatoso pouco indiferenciado e com elevado índice de "pega" que o torna bastante interessante nos "screenings" de quimioterapia neoplásica.

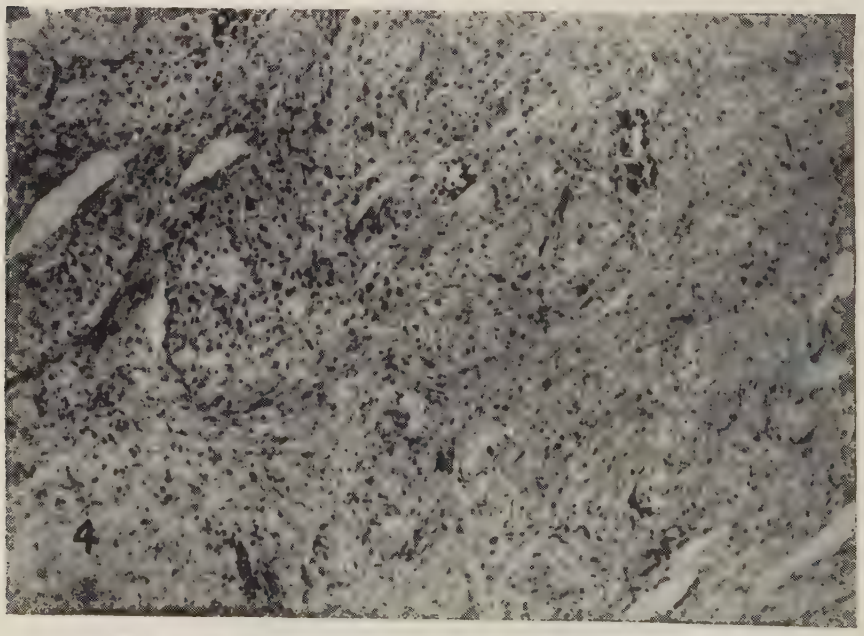


1 — Tumor "original". Pequeno aumento. H.E. Aspecto geral.

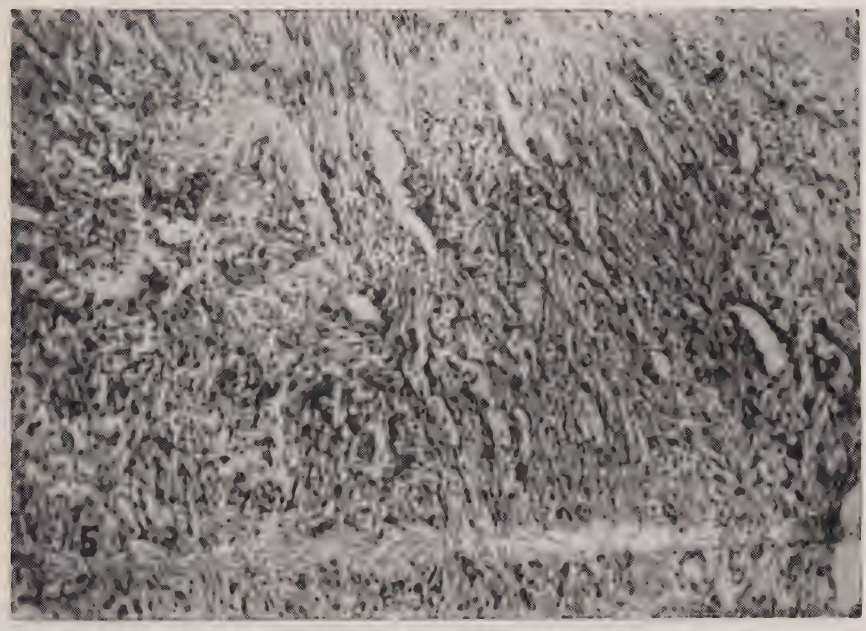
2 — Tumor 'original". Aumento médio. H. E.



3 — Tumor "original". Grande aumento (imersão). H. E.

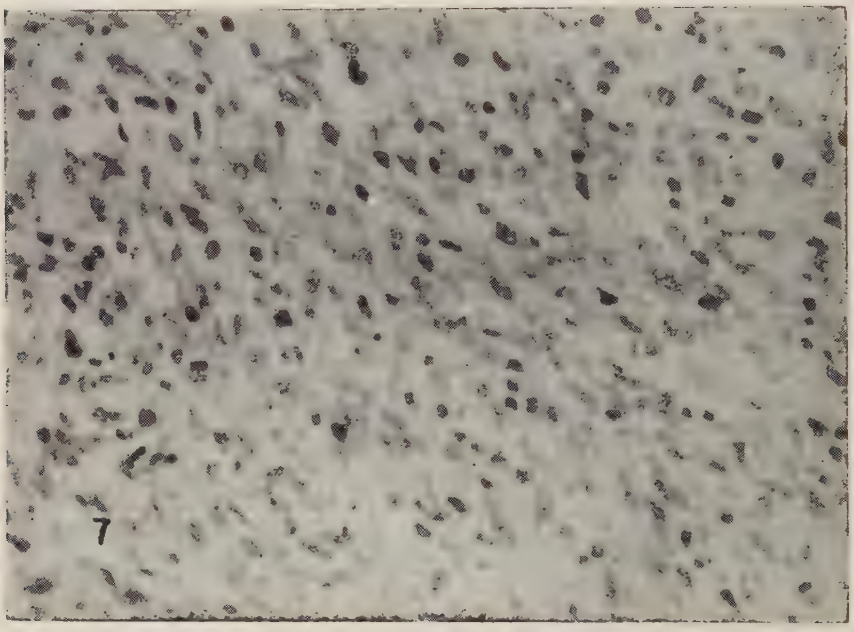


4 — Tumor "original" Hematoxilina fosfo-túngstica. Pequeno aumento. Moderada colagenisação dos feixes de células alongadas e escassa vascularização.

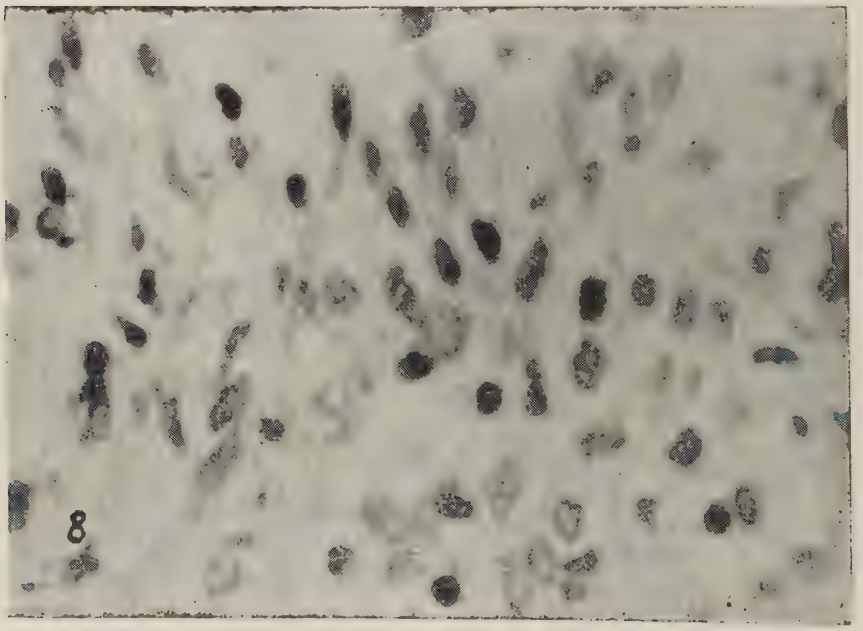


5 — Tumor "original". Van Gieson. Pequeno aumento. Moderada colagenisação dos feixes de células alongadas.

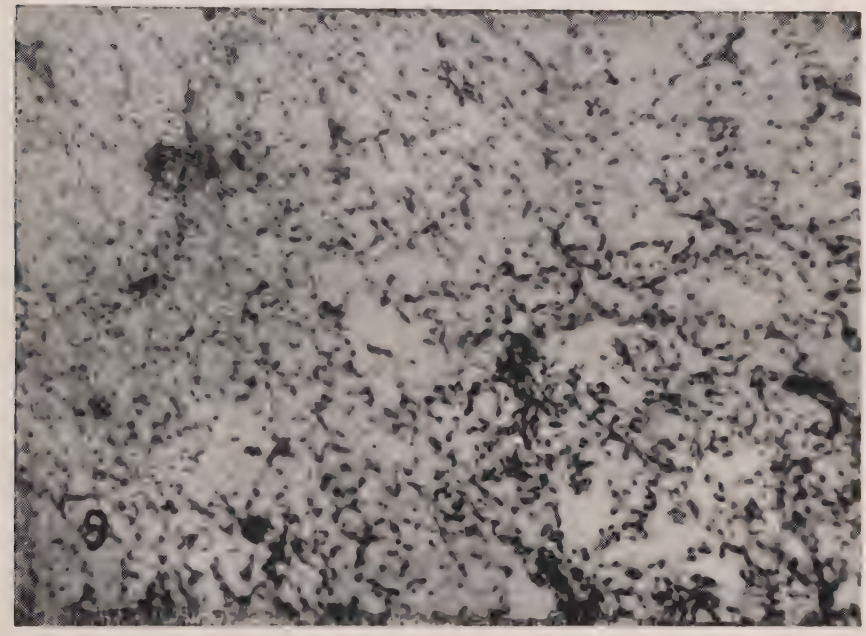
6 — Segunda passagem. H.E. Pequeno aumento. Escassas figuras de mitose. Áreas mixomatosas. Células arredondadas e alongadas misturadas difusamente com predominância das células alongadas.



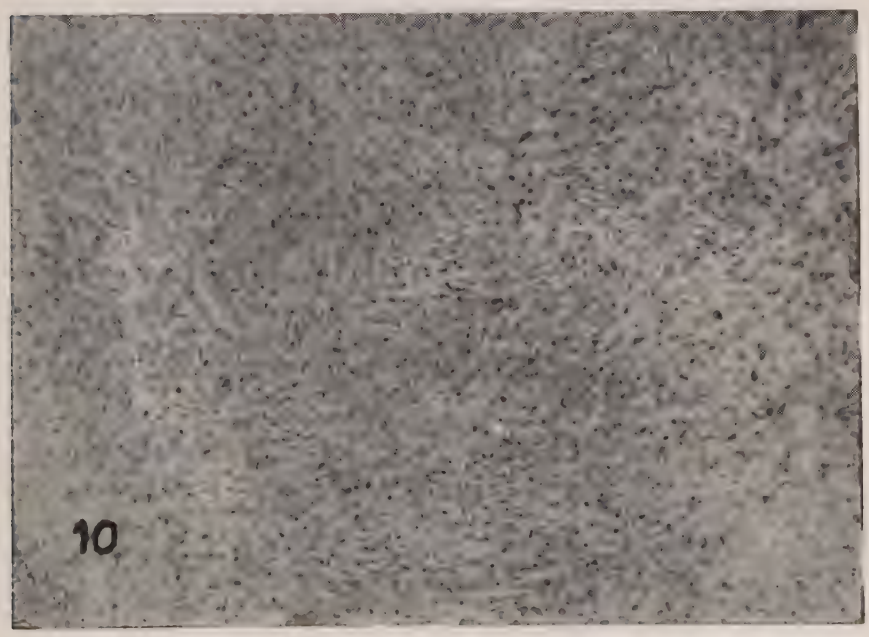
7 — Segunda passagem. Aumento médio. H.E. Mesmas características da microfotografia 6.



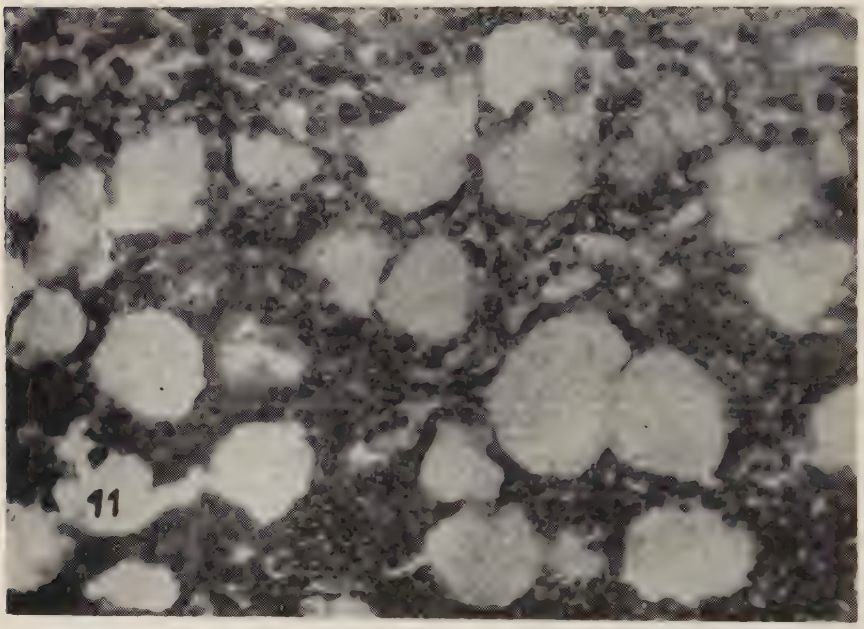
8 — Segunda passagem. Grande aumento (imersão). H.E. Mesmas características da microfotografia 6.



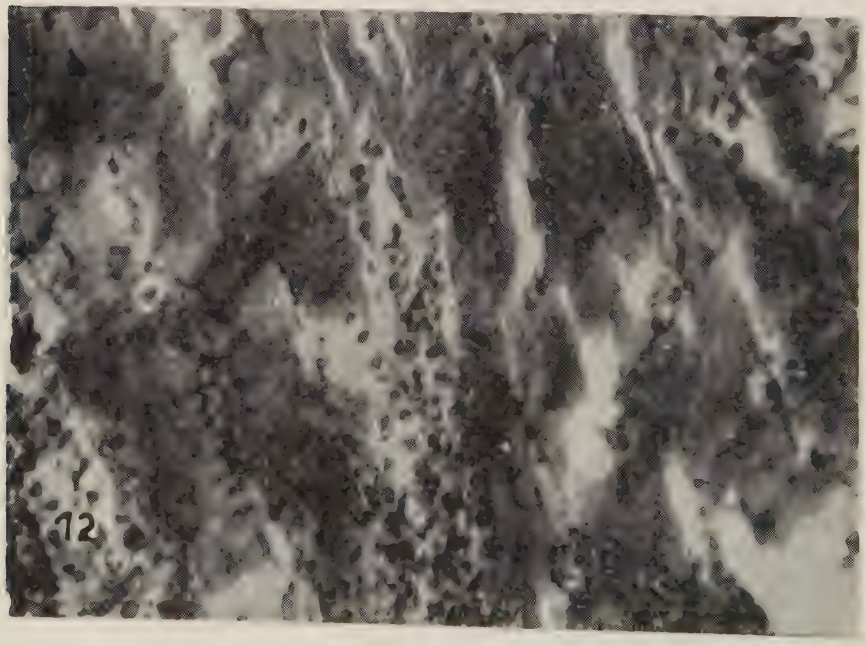
9 — Sexta passagem. Pequeno aumento. H.E. Aspecto necrótico mixomatoso.



10 — Décima terceira passagem. Aumento pequeno. H.E. Aparência neurofibromatosa.



11 — Décima passagem. Aumento medio. H.E. Invasão do tecido adiposo.



12 — Décima segunda passagem. Aumento médio. H.E. Invasão das fibras musculares.

SOMMAIRE

On présente les caracteristiques histologiques et le comportement aux greffages d'une nouvelle tumeur greffable du rat qui a apparu spontanément chez un un rat mâle de la souche Wistar à l'âge de quatorze mois.

Actuellement la tumeur a pu être greffé 45 fois avec un rendement très elevé de greffes positives (pratiquement 100%) chez de rats de souches Wistar et Sprague Dawley.

Histologiquement nous avons classifié cette tumeur comme étant du type fibrossarcomateux. Nous appelons — *Sarcoma I.A.U.R. — 1* — à cause de son apparition dans notre élevage de rats à l'Institut d'Antibiotiques de l'Université de Recife.

SUMMARY

The histologic characteristics and transplantable behaviour of new tumor that arose spontaneously in a stock male Wistar rat one year and four months old, are presented. This tumor is now at the 45th transplant generation, and it is growing well (100% positive "takes") in Wistar and Sprague Dawley rats. It shows fibrosarcomatous histologic pattern and was named — *Sarcoma I.A.U.R. — 1* because it appeared and was studied in the Institute of Antibiotics, University of Recife.

ZUSAMMENFASSUNG

Vorgelegt werden die histologischen Eigenschaften sowie das Verhalten der Transplantate eines neuen uebertragbaren Ratten-Tumors, welcher sich spontan an einer maennlichen Ratte des Stammes Wistar, ein Jahr und vier Monate alt, bildete. Gegenwaertig befindet sich besagter Tumor in seiner 45. Transplantation mit grossem Anteil eines positiven "Angehens" (100% in der Praxis) in Ratten der Staemme Wistar und Sprague Dawley. Vom histologischen Standpunkt aus wurde der Tumor als Fibrosarkom-Type klassifiziert und mit *Sarkom I.A.U.R. — 1* bezeichnet, weil er in der Rattenkolonie des Antibiotischen Institutes der Universitaet Recife entdeckt und studiert wurde.

STRESCZENIE

Podano histologiczna charakterystyke i zachowanie sie w przeszczepach nowego nowotworu, który pojawil sie spontanicznie wsrod 16-miesiecznych szczurów Wistar (samców). Jest to dotychczas nieopisany nowotwór, który rozwija sie dobrze (100% przeszczepialnosc) w 45 generacji szczurów Wistar i Sprague Dawley. Nowotwór ten odpowiada histologicznie fibro-sarcoma e zostal nazwany *Sarcoma I.A.U.R. —1* poniewaz pojawil sie i zostal rospoznany w Instytucie Antybiotkow, Uniwersytetu w Recife.

REFERÊNCIAS

STEWART, H. L.; SNELL, K. C.; DUNHAM, L. J. and SCHLYEN, S. M. (1959). *Transplantable and Transmissible Tumors of Animals.* Section XII — Fascicle 40.; ATLAS OF TUMOR PATHOLOGY; Published by the *Armed Forces Institute of Pathology.* Washington, D. C.

J. O. Falcão de Morais & M. H. Dália Maia

Uma Contribuição ao Estudo Taxonômico do Gênero STREPTOMYCES — Uma Tentativa de Simplificação

A 115 culturas de *Streptomyces* é aplicado um método simplificado de estudo taxonômico.

São feitas determinações morfológicas, culturais — em quatro meios gelosados, apenas — e bioquímicas. As últimas constam da verificação do comportamento em relação a gelatina, amido e nitrato; assimilação de salicina, xilose, manitol, lactose, ramnose, sacarose e rafinose; atividade antagonista. Várias Séries (Grupos) são caracterizadas; muitas espécies são descritas dentro de um padrão estabelecido; algumas Séries e espécies são comentadas.

Identificar um *Streptomyces* recém isolado, mesmo dispondo de muitos dados a seu respeito, pela utilização da literatura existente, ainda é uma tarefa difícil e às vêzes impossível. Às descrições falta uniformidade; fornecem-se caracteres nem sempre importantes e em excesso ou êles são dados em número reduzido. Muitas vêzes as descrições se baseiam no emprêgo de um excessivo número de meios de cultura — muitos dêles complexos e de difícil reprodução — e, além disso, através do estudo de uma única amostra.

Sabendo-se como uma determinada amostra de *Streptomyces* pode se apresentar de modo diferente quando cultivada em partidas distintas do mesmo meio — especialmente no que tange à produção de pigmentos — será fácil prever que o problema se complica quando se trata do estudo de amostras homólogas. Daí ser tão raro, para a maioria das espécies, haver coincidência entre uma descrição e as qualidades reveladas por uma cêpa em análise.

Donde se vê que as descrições de espécies deveriam sempre basear-se num estudo duplicado ou triplicado de várias amostras e nunca num só estudo de uma única cêpa.

O presente artigo trata da experimentação de um método simplificado de estudo taxonômico de *Streptomyces* e da descrição de espécies dentro de um esquema estabelecido.

METODOLOGIA

Os autores conduziram seu trabalho no sentido de obter as informações relacionadas a seguir.

1. Coloração do micélio vegetativo
2. Coloração do micélio aéreo
3. Tipo morfológico (nomenclatura de Pridham *et al.*, 1958)
4. Capacidade de liquefazer gelatina
5. Assimilação de salicina, xilose, manitol, lactose, ramnose, sacarose e rafinose
6. Produção de pigmentos solúveis
7. Hidrólise de amido
8. Redução de nitrato a nitrito
9. Crescimento sôbre celulose
10. Capacidade antagonista.

Os ítens 1 e 2, empregados para determinação da Série (segundo Baldacci) a que pertence a amostra, são obtidos, o primeiro observando as culturas até o 5.º dia; quanto ao micélio aéreo é observado aos 30 dias de incubação (para que êle assuma uma coloração definitiva, firme; há casos em que esta muda. Um exemplo disso é o *S. erythrogriseus*: até 15 dias seus micélio aéreo é cinza; entre 15 e 30 dias, porém, apresenta uma pigmentação vermelho-ferrugem (Morais & D. Maia, 1959). Após 30 dias em geral se dá um esmaecimento na tonalidade do micélio aéreo dos *Streptomyces*, devendo-se, por isso, evitar anotações posteriores a êsse prazo. Talvez o ótimo para êsse fim esteja compreendido entre 20 e 25 dias).

A morfologia é anotada pela observação microscópica das colônias desenvolvidas em placa de Petri com o meio de Czapek; sòmente quando êste meio não proporcionar formação de micélio aéreo é que se utilizará um outro conveniente. Geralmente 5 dias de desenvolvimento bastam para a observação. Os tipos morfológicos são aquêles indicados por Pridham *et al.* (*op. cit.*). Qualquer particularidade morfológica será anotada.

Liquefação de gelatina: Anotar % de liquefação aos 10, 15, 20 e 30 dias. Das nossas observações resulta a conclusão de que há uma estreita correspondência entre capacidade de liquefazer gelatina e de peptonizar leite. Raras são as culturas que fogem a esta regra. Como em gelatina as observações são mais simples e a produção de pigmentos mais bem notada, nós optamos por aquêle meio.

Assimilação de compostos de carbono: Após uma análise de nossos próprios resultados e de relatos de Benedict *et al.* (1955), foram selecionados para emprêgo os 7 compostos antes referidos, com base na percentagem de resultados positivos e negativos para cada um dêles. No quadro I estão expostos êsses resultados.

QUADRO I

Análise dos resultados de utilização de carbono (dados de Benedict et al., 1955 e dos autores). Os compostos são grupados na ordem decrescente de assimilação positiva

Composto	Amostras Provadas	Positivas	Negativas	% Positivas	% Negativas
Salicina	205	153	52	74,6	25,4
Xilose	191	130	61	68,0	32,0
Manitol	204	127	77	62,2	37,8
Lactose	200	116	84	58,0	42,0
Ramnose	195	80	115	41,0	59,0
Sacarose	201	54	147	26,9	73,1
Rafinose	201	50	151	24,9	75,1

O meio básico é o agar-Czapek sem açúcar, como usado por Shimo *et al.* (1959). As soluções dos compostos orgânicos são esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio básico a 45-50°C em quantidade suficiente para obter-se a concentração de 1% do composto no meio. Os meios são distribuídos em tubos pequenos (76 mm x 10 mm) à razão de 1 ml por tubo os quais são inclinados. Utilizamos para inóculo um cultivo esporulado de 5 a 30 dias (de agar-Czapek ou outro meio, conforme a produção de esporos, podendo ser usadas as próprias culturas em processo de estudo), inoculando-se com alça em anel. Para cada amostra de *Streptomyces* apenas um tubo de cada composto é usado, além de contrôle positivo (glicose) e de um negativo (meio básico). Mesmo assim não há necessidade de duplicados e os resultados são sempre claros. Leitura aos 10 dias de incubação. (O meio básico de Pridham e Gottlieb (1948), também poderá ser usado e maior número de tubos de cada composto poderá ser empregado, principalmente quando se faz um estudo de poucas culturas; no caso presente seguimos o método indicado mais como medida de economia e simplificação).

Os dados correspondentes aos demais ítens são obtidos da maneira usual. Embora cada um dêles isoladamente possa ter seu valor refutado ou pôsto em dúvida, não se pode negar que o seu conjunto tem expressão para o fim de se determinar uma espécie. Muita pesquisa terá que ser feita antes que se possa desprezar tal ou qual dado como inútil.

Temperatura: A grande maioria dos *Streptomyces* do solo pertence ao grupo mesofílico, vegetando muito bem a 30°C. Achamos que a preferência por temperatura compreendida entre 20 e 40°C é mais um atributo de amostras particulares ou cêpas que de espécies. Dêsse modo resolvemos trabalhar à temperatura de 30°C sem qualquer outra investigação em tôrno dêsse aspecto.

Meios de cultura empregados: Para o estudo cultural nós usamos: agar-Czapek, Meio L, Glicose-agar e Batata-glicose-agar (êstes dois últimos fornecem geralmente a mesma informação sôbre a côr do micélio vegetativo; entretanto, ambos são usados porque Glicose-agar indica a produção de pigmento solúvel em meios orgânicos — e neste ponto substitui com vantagem o Agar-nutritivo — enquanto o meio de batata é usado por Baldacci para definir as Séries, não havendo vantagem alguma na criação de outro critério para êste fim). Os dois primeiros substratos se prestam principalmente para observar a coloração do micélio aéreo. O conjunto dos quatro fornece um quadro suficientemente rico de detalhes das chamadas características culturais dos *Streptomyces*, não havendo necessidade de recorrer-se a outros meios gelosados.

Para as determinações bioquímicas são usados gelatina-peptona (isento de glicose), amido-nitrato e amido-agar. A solução de Czapek (sem sacarose) com fitas de papel de filtro serve para o teste de crescimento sôbre celulose; e com 2% de agar lavado é usada como base para assimilação de carbono.

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS EMPREGADOS

1. Agar-Czapek: $NaNO_3$, 2 g; K_2HPO_4, 1 g; $MgSO_4.7H_2O$, 0,5 g; KCl, 0,5 g; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01 g; Sacarose, 30 g; Agar, 20 g; Água destilada, 1000 ml; pH 6,6.

2. Meio L ("Yeast extract agar"): Extrato de levedura, 4 g; Extrato de malte, 10 g; Glicose, 4 g; Agar, 20 g; Água destilada, 1000 ml; pH 7,3.

3. Glicose-agar: Peptona, 5 g; Glicose, 20 g; NaCl, 5 g; Agar, 20 g; Água destilada, 1000 ml.

4. Batata-glicose-agar: Decocto de 200 g de batatas descascadas, filtrado através de algodão, acrescido de: Glicose, 5 g; Agar, 20 g; Água de torneira, até 1000 ml; pH não ajustado.

5. Amido-nitrato (Para redução a nitrito): Amido solúvel, 20 g; K_2HPO_4, 1 g; $MgSO_4.7\ H_2O$, 0,5 g; KCl, 0,5 g; $NaNO_3$, 2 g; $CaCO_3$, 2 g; Água destilada, 1000 ml.

6. Gelatina-peptona: Peptona, 5 g; Extrato de carne, 5 g; Gelatina, 200 g; Água de torneira, 1000 ml; pH 7,4. 110°C, 30 minutos.

7. Amido-agar: O meio 5 adicionado de 20 g de agar.

A esterilização, quando não indicada, é obtida autoclavando-se a 115°C durante 30 minutos.

RESULTADOS

A aplicação do método indicado às 115 cêpas relacionadas no Quadro II permitiu:

1. Diagnosticar as espécies: *albosporeus, californicus, diastatochromogenes, erythrogriseus, flavovirens, fradiae, griseus* (Krainsky, 1914; não Waksman & Henrici), *lavendulae, olivaceus, olivochromogenes.*

2. Caracterizar as Séries ou Grupos (segundo Baldacci): *Albidoflavus*, *Albosporeus*, *Albus*, *Caeruleus*, *Diastaticus*, *Flavoviridis* (1), *Flavus-Aureus* (2), *Fradiae*, *Griseoincarnatus*, *Griseus*, *Lavendulae*, *Madurae*, *Rimosus*, *Roseoflavus*, *Roseus*, *Violaceus* e *Viridis*; em alguns casos, para chegar às espécies há necessidade de estudos mais extensos.

3. Propor as variedades: *S. glaucus* var. *achromogenes*; *S. flavovirens* var. I e *S. flavovirens* var. II.

Quanto a diagnóstico, ainda poderá ser apresentado o seguinte balanço quantitativo:

Série e espécie diagnosticadas	65
Série diagnosticada; espécie, não	35
Série e espécie não diagnosticadas	15
Amostras estudadas	115

QUADRO II

CULTURAS ESTUDADAS. DIAGNÓSTICO OBTIDO

CULTURA		DIAGNÓSTICO	
Número	Histórico	Série	Espécie
IAUR 3010	*S. griseus* ATCC 10137	*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky?
" 3011	*S. coelicolor* NRLL B-1257	*Violaceus*	*S. violaceoruber*
" 3019	*S. olivaceus* ATCC 10636	*Flavus-Aureus*	*S. olivaceus*
" 3029	*S. californicus* ATCC 3312	*Violaceus*	*S. californicus*
" 3042	*S. fradiae* ATCC 10745	*Fradiae*	*S. fradiae?*
" 3055	*S. californicus* Di-10	*Violaceus*	*S. californicus*
" 3074	*A. novacaesarae* 1133 (Ciferri)	*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
" 3080	*A. madurae* 1308 (Ciferri)	*Madurae*	*S. madurae*
" 3088	*S. aureofaciens* CBS (LJ)	*Flavus-Aureus*	*S. olivaceus*
" 3092	*S. olivaceus* CBS (NRRL)	*Flavus-Aureus*	*S. olivaceus*
" 3095	*S. californicus* CBS (NRRL)	*Violaceus*	*S. californicus*
" 4002	A-3 (IAUR)	*Lavendulae*	*S. lavendulae?*
" 4005	A-9 (IAUR)	*Flavoviridis*	*S. flavovirens*
" 4008	A-57 (IAUR)	*Violaceus*	*S. californicus*
" 4014	A65 (IAUR)	*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
" 4024	A-83 (IAUR)	*Flavus-Aureus*	*S. tanashiensis?*
" 4045	A-114 (IAUR)	*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky?
" 4049	N-7 (IAUR)	*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*

(1) Em nossa opinião *A. flavoviridis* Krassilnikov, 1941, é idêntico a *S. flavovirens* (Waksman, 1923) Waksman & Henrici, 1948. Como a segunda denominação é mais antiga, achamos que a Série deveria ser *Flavovirens*.

(2) Preferimos, neste trabalho, englobar as duas Séries numa única, pois nossas culturas apresentam características das duas, não nos sendo possível optar por uma das Séries.

CULTURA		DIAGNÓSTICO	
Número	Histórico	Série	Espécie
" 4057	S-3 (IAUR)	*Albus*	*S. albus?*
" 4067	28HCPs (IAUR)	*Roseoflavus*	?
" 4090	EM-9 (IAUR)	*Flavus-Aureus*	*S. graminearus?*
" 4094	OL-15 (IAUR)	*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
" 4095	PB-20 (IAUR)	*Flavoviridis*	*S. flavovirens*
" 4096	PB-22 (IAUR)	*Fradiae*	*S. fradiae*
" 4105	281 (IAUR)	*Violaceus*	*S. californicus*
" 4107	373 (IAUR)	*Cinereoruber ?*	*S. cinereoruber?*
" 4108	407 (IAUR)	*Flavus-Aureus*	*S. graminearus?*
" 4110	458 (IAUR)	*Roseoflavus*	*S. microflavus?*
" 4124	612 (IAUR)	*Flavus-Aureus*	*S. xanthophaeus?*
" 4130	659 (IAUR)	*Flavoviridis*	*S. flavovirens*
" 4133	820 (IAUR)	*Flavoviridis*	*S. flavovirens* var. I
" 4159	882 (IAUR)	*Flavoviridis*	*S. flavovirens* var. I
" 4191	1831 (IAUR)	*Violaceus*	*S. violaceoruber* (var.?)
" 4192	800 (IAUR)	*Roseus*	*S. roseusporus*
" 4193	1192 (IAUR)	*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky?
" 4194	1269 (IAUR)	*Rimosus*	*S. diastatochromogenes*
" 4195	1028 (IAUR)	*Rimosus*	*S. diastatochromogenes*
" 4196	1077 (IAUR)	*Rimosus*	*S. diastatochromogenes*
" 4197	1202M (IAUR)	*Diastaticus*	*S. violaceoruber*
" 4198	825 (IAUR)	*Diastaticus*	*S. violaceoruber*
" 4199	1234 (IAUR)	*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
" 4200	996 (IAUR)	*Rimosus*	*S. diastatochromogenes?*
" 4201	921 (IAUR)	*Lavendulae*	*S. lavendulae* var. *brasilicus*
" 4202	891 (IAUR)	*Roseoflavus*	*S. roseoflavus*
" 4203	855 (IAUR)	*Flavoviridis*	*S. flavovirens*
" 4204	1033 (IAUR)	?	?
" 4205	861 (IAUR)	*Cinereoruber ?*	*S. cinereoruber?*
" 4206	887 (IAUR)	?	?
" 4207	865 (IAUR)	*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky?
" 4208	1015 (IAUR)	*Flavoviridis*	*S. flavovirens* var II
" 4209	1027 (IAUR)	*Flavoviridis*	*S. flavovirens*
" 4210	1002 (IAUR)	*Caeruleus*	?
" 4211	1020 (IAUR)	*Flavus-Aureus*	*S. xanthophaeus?*
" 4212	956a (IAUR)	*Violaceus*	*S. coelicolor?*
1173		*Griseoincarnatus*	*S. erythrogriseus*
1438		*Fradiae*	*S. fradiae*
1447		*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*
1478		*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*
1482		*Viridis*	*S. viridochromogenes*
1505		*Fradiae*	?
1514		*Diastaticus ?*	?
1568		*Diastaticus ?*	?
1572		*Griseoincarnatus*	*S. erythrogriseus*
1574		*Griseoincarnatus*	*S. erythrogriseus*
1601		*Griseoincarnatus*	*S. erythrogriseus*
1602		*Griseoincarnatus*	*S. erythrogriseus*
1621		*Griseoincarnatus*	*S. erythrogriseus*
1641		*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*
1652		*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*
1667		*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*
1671		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky?
1698		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky?
1732		*Flavus-Aureus ?*	*S. flavochromogenes?*
1746		*Diastaticus*	*S. cellulosae?*
1759		*Diastaticus ?*	?
1827		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky

CULTURA		DIAGNÓSTICO	
Número	Histórico	Série	Espécie
1862		*Griseoincarnatus*	*S. erythrogriseus*
1872		*Diastaticus* ?	?
1899		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
1907		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
1923RF		*Albus*	?
1923S		*Diastaticus*	*S. olivochromogenes?*
1948		*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*
1965		*Fradiae*	*S. fradiae*
2030		*Griseoincarnatus*	*S. erythrogriseus*
2071		*Fradiae*	*S. fradiae?*
2082		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
2083		*Albosporeus*	*S. albosporeus?*
2084		*Diastaticus*	*S. cellulosae?*
2094		*Diastaticus* ?	?
2113		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
2244		*Albidoflavus*	?
2291		*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*
2306		?	?
2308		*Flavus-Aureus* ?	?
2309		*Violaceus*	?
2311		*Diastaticus*	*S. cellulosae?*
2318		*Diastaticus*	*S. cellulosae?*
2324		*Viridis*	*S. glaucus* var. *achromogenes n. var.*
2339		*Violaceus*	?
2342		*Diastaticus*	*S. diastatochromogenes*
2351		*Diastaticus*	*S. cellulosae?*
2433		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky?
2443		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
2441		*Diastaticus*	*S. griseus* Krainsky
2445		*Flavus-Aureus*	?
2449		*Lavendulae*	?
2450		*Lavendulae*	*S. levendulae*
2453		?	?
2453A		?	?
2463		*Albus*	*S. albus?*
2467		*Violaceus*	*S. violaceoniger?*
2470		*Rimosus* ?	?
2572		*Griseus*	?
2573		*Fradiae*	*S. fradiae*

NOTA: As culturas de Números 1173 a 2573 foram isoladas no Instituto de Antibióticos; não pertencem, porém, à Coleção IAUR.

Daremos agora a descrição padronizada das culturas diagnosticadas e daquelas que, mesmo sem diagnóstico estabelecido, apresentam qualidades interessantes.

As descrições serão apresentadas em duas partes separadas: uma constará das características culturais nos quatro meios empregados; a outra — em quadros — encerrará morfologia e propriedades bioquímico-fisiológicas.

SIMPLIFICAÇÕES EMPREGADAS

CZ: Agar-Czapek
ML: Meio L ("Yeast extract agar")

GA: Glicose agar
BGA: Batata glicose agar
1: Micélio aéreo esporulado (30 dias)
2: Desenvolvimento vegetativo
3: Reverso da Cultura (30 dias)
4: Pigmento solúvel no substrato (até 30 dias)
Côres: Referem-se ao "Dictionary of Color" de Maerz & Paul, segunda edição, McGraw-Hill, 1957.
Morfologia: Segundo Pridham *et al.*, 1958:
RF = *Rectus-Flexibilis;* RA = *Retinaculum-Apertum;* S = *Spira;*
MVS = *Monoverticillus-Spira.*
Conídios: Gl = Globosos ou espéricos; Ov = Ovais ou elipsóides; Cil = Cilindróides.
Ação sôbre gelatina: Exemplos — : (100:10;0); = Liquefação total aos 10 dias; pigmento solúvel não produzido. (50:30; café) = liquefação de 50% do meio aos 30 dias; pigmento solúvel côr de café.

Série *Lavendulae*

Culturas 2449, 2450, 4002 e 4201; sendo 2450 *S. lavendulae* típico, 4201 *S. lavendulae* var. *brasilicus* e as demais, espécies independentes ou variedades de *S. lavendulae.*
S. lavendulae (Waksman & Curtis, 1916) Waksman & Henrici, 1948.
Amostra 2450.
CZ: 1. Marrom claro, lavanda, 4A8; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
ML: 1. Marrom claro, lavanda, 4A8; 2. Incolor; 3. Incolor a creme; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza claro, rosado; 2. Incolor; 3. Creme claro; 4. Ausente.
BGA: 1. Cinza-lavanda, 4B7; 2. Incolor; 3. Incolor a castanho claro. 4. Ausente.
(Quadro III).

S. lavendulae var. *brasilicus* Morais, D. Maia & Genn, 1958.
Amostra 4201.
CZ: 1. Róseo-tijolo, 4A9; 2. Incolor; 3. Incolor a creme; 4. Ausente.
ML: 1. Róseo-vermelho, 5E9; 2. Incolor; 3. Marrom claro; 4. Ausente.
GA. 1. Marrom-rosado, 5A9; 2. Creme; 3. Castanho; 4. Amarelo.
BGA: 1. Ausente; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
(Quadro III).

Amostra 2449.
CZ: 1. Cinza-violáceo claro, 4B1; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
ML: 1. Cinza-violáceo claro, 4B1; 2. Creme-amarelado; 3. Creme; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza-branco; 2. Creme-amarelado; 3. Creme; 4. Ausente.
BGA: 1. Ausente; 2. Incolor; 3. Creme; 4. Ausente.
(Quadro III).

Amostra 4002.
CZ: 1. Cinza-róseo, claro, escasso; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
ML: 1. Vinoso, 5G7; 2. Castanho-alaranjado; 3. Castanho; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza claro; 2. Amarelado; 3. Castanho claro; 4. Ausente.
BGA: 1. Ausente; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
(Quadro III)

Comentário: A Série *Levendulae* é uma das mais fáceis de identificar; compreende *Streptomyces* com desenvolvimento vegetativo incolor e micélio aéreo com tonalidade lavanda (cinza-arroxeado) mais ou menos pronunciada. A espécie *S. lavendulae* poderá ser identificada pela morfologia (predominantemente RF, podendo ser RA), pela incapacidade de

assimilação dos compostos de carbono geralmente usados e por sua ação antagonista ampla. O não atendimento dessas condições deve levar a pensar-se em variedades ou outras espécies da Série; neste caso o problema se complica pela falta de conhecimento sôbre essas variedades ou espécies.

Série *Roseus*

S. roseosporus Morais & D. Maia, *nom. nov.* (*Streptomyces venezuelae* var. *roseospori*, Morais, D. Maia & Genn, *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, 1*, 99-106, 1956).
Sinônimo possível: *Actinomyces roseus Duché* (1934).
Amostra 4192.
CZ: 1. Branco-acinzentado a rosado, escasso; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
ML: 1. Rosa claro, 2A8; 2. Bege; 3. Incolor a creme; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza-branco; 2. Creme; 3. Creme-amarelado; 4. Ausente.
BGA: 1. Creme; 2. Incolor; 3. Creme; 4. Ausente.

Comentário: Morais & D. Maia (trabalho não publicado) numa revisão da espécie *Actinomyces roseus* justificam a preferência pelo novo nome *Streptomyces roseosporus* e não por *Streptomyces* roseus para as amostras que êles haviam denominado *S. venezuelae* var. *roseospori*. Esta preferência decorreu do fato de o nome *roseus* estar ligado a muita confusão, tendo sido atribuído por alguns autores (Namyslowsky, 1912; Krassilnikov, 1949; Waksman e Lechevalier, 1953) a *Streptomyces* com micélio vegetativo róseo-avermelhado; e, erradamente, por outros (Duché, 1934; Baldacci *et al.*, 1954; Baldacci, 1959) a microorganismos com micélio vegetativo incolor.

Série *Roseoflavus*

Inclue as amostras 4110 e 4202, de mesma espécie, e a de número 4067, relacionada com aquelas, diferindo apenas na morfologia. Culturalmente não podem ser separadas, a descrição seguinte compreendendo as três amostras.
CZ: 1. Creme a branco; 2. Incolor a amarelado; 3. Creme a amarelo; 4. Ausente.
ML: 1. Róseo, 2C8 a creme-róseo; 2. Castanho claro a amarelado; 3. Incolor a castanho claro; 4. Ausente.
GA: 1. Branco a róseo, 2C8; 2 Amarelo a ouro; 3. Creme a amarelo; 4. Ausente.
BGA: 1. Cinza-creme; 2. Castanho claro ou amarelo; 3. Castanho-amarelado; 4. Ausente.
(Quadro III).

Comentário: Não podemos afirmar a que espécie as amostras 4110 e 4202 pertencem; elas estão mais próximas do *S. microflavus* (Krainsky, 1941) Waksman & Nenrici, 1948, que do *S. roseoflavus* Arai, 1951. Esta última espécie deve ser olhada antes como da Série *Fradiae*, talvez se tratando mesmo da espécie *S. fradiae;* nossas amostras diferem do *S. roseoflavus* em alguns pontos de certo valor (pigmento em gelatina, ausência de crescimento em celulose, por exemplo). Notemos que as três amostras têm um ponto comum com *S. fradiae:* antagonismo igualmente intenso contra Gram-positivos e Gram-negativos.

Série *Fradiae*

S. fradiae (Waksman & Curtis, 1916) Waksman & Henrici, 1948.
Amostras 1438, 1965, 2071, 2573, 3042 e 4096.
CZ: 1. Róseo-branco a marrom-rosado, 12A7; 2. Incolor; 3. Creme a alaranjado (às vêzes só há alguns pontos alaranjados); 4. Ausente.

ML: 1. Branco a róseo, falho, escasso; 2. Creme a laranja; 3. Laranja ou incolor; 4. Ausente.
GA: 1. Branco sujo a róseo-tijolo, 5B9; 2. Incolor a creme; 3. Castanho-alaranjado; 4. Ausente.
BGA: 1. Róseo, 3B8 a 3A9 (1438 e 2573); cinza-branco (2071); ou ausente (1965, 3042 e 4096); 2. Incolor; 3. Incolor a castanho-alaranjado; 4. Ausente.
(Quadro III).

Amostra 1505.
Sob o ponto de vista cultural comporta-se como as 6 anteriores; bioquìmicamente, porém, distância-se o bastante para não a podermos considerar *S. fradiae*.

Comentário: As 6 amostras citadas acima apresentam de comum o micélio aéreo róseo, o desenvolvimento vegetativo incolor passando a alaranjado (em agar Czapek é muito típico o aparecimento de colônias salteadas com reverso laranja a marrom claro, quando a cultura envelhece) e a atividade antagonista ampla (quase sempre é da mesma intensidade para *S. aureus* e *E. coli* em estrias cruzadas). Geralmente uma cultura recém-isolada, com as características assinaladas, produz neomicina. As qualidades secundárias como ação sôbre amido, nitrato e celulose, se mostram variáveis, o mesmo acontecendo com a utilização de compostos de carbono, prova esta que segundo alguns autores, é de grande valia para separação de espécies.

Série *Griseoincarnatus*

S. erythrogriseus Morais & D. Maia (1959).
Amostras 1173, 1572, 1574, 1601, 1602, 1621, 1862 e 2030.
CZ: 1. Cinza, 14A1; 2. Incolor; 3. Castanho, castanho-amarelado ou chocolate claro; 4. Ausente ou amarelado (1602 e 1862).
ML: 1. Cinza escuro, 14A1 a 14A5; 2. Incolor a castanho claro (1862 = alaranjado); 3. Castanho claro a cinza escuro; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza escuro, às vêzes com manchas rosa-avermelhadas; 2. Marrom-alaranjado; 3. Chocolate; 4. Marrom-avermelhado.
BGA: 1. Cinza-esverdeado, 15C1, com pontos brancos ou róseos; 2. Marrom quase chocolate, ou marrom-alaranjado (1572 = incolor a castanho claro); 3. Vermelho-chocolate (1572 = marrom claro); 4. Marrom-avermelhado, marrom claro ou ausente.
(Quadro IV).

Comentário: A espécie *S. erythrogriseus* é bastante comum em nossos solos. Distingue-se do *S. erythraeus* pelo micélio aéreo (é cinza, quase sempre se recobrindo, ao envelhecer a cultura, com uma coloração róseo-ferrugem; o micélio aéreo do *S. erytraeus* é branco). As amostras dessa espécie são geralmente ativas contra Gram-positivos. Algumas produzem um antibiótico indicador ácido-básico, erigrisina, (Andrade Lira *et al.*, 1959). Para seguir Waksman (Waksman & Lechevalier, 1953) a espécie seria classificada no grupo *Ruber*.

Série *Violaceus*

Encontramos grande dificuldade para determinar espécies nesta Série. Apenas *S. californicus* e *S. violaceoruber* (veja-se Kutzner & Waksman, 1959) puderam ser bem caracterizados pela aplicação do roteiro seguido. Algumas amostras exigiram estudos mais aprofundados. Às vêzes se torna difícil até a escolha entre as Séries *Violaceus*, *Cinereoruber* e *Albosporeus* pela possível confusão entre as tonalidades de vermelho e violeta do desenvolvimento vegetativo. Realmente os *Streptomyces* com micélio ve-

Quadro 3

Amostra	Morfologia	Conídios	Colonias	Amido ou hidrólise em mm, 10 dias	Nitratos redução a nitritos	Celulose	Assimilação: [illegible]	Xilose	[illegible]	Lactose	[illegible]	[illegible]	[illegible]	Antagonismo, Halo em mm: S. aureus	E. coli	Ped. [illegible]	Myc. smeg.	Série	Espécie
2450	RP	Ol	100:30; 0	1	-	-	-	-	•	-	-	-	-	25	25	7	25	Lavendulae	S. lavendulae
4201	RA	Ol a Ov	0:30; 0	1	•	-	-	-	•	-	-	-	-	25	13	0	24	•	S. lavendulae e . brasilicus
2449	RP	Ol	90:30; marrom	2	••••	-	•	•		•	-	•	-	0	0	0	0	•	?
4002	RP-RA	Ol a Ov	100:10; 0	9	••••	••	•	•		-	-	-	-	0	0	0	0	•	S. lavendulae
4192	RP	Ol a Ov	100:15; 0	5	••••	-	•	•	-	•	•	-	-	0	0	0	0	Roseus	S. roseosporus
4110	RA-S	•	100:30; marrom amarelado	3	•••	-	•	•	-	-	-	-	-	12	10	0	14	Roseoflavus	S. microflavus
4202	S-RA	•	100:20; marrom claro	4	•	-	•	•	-	-	-	-	-	20	15	0	10	•	•
4067	RP	•	100:15; ouro	5	-	-	•	•	-	•	-	•	-	11	11	0	20	•	?
1438	RA	•	100:30; 0	13	••••	-	•	•	-	•	-	-	-	22	24	5	25	Fradiae	S. fradiae
1965	RA	Ol	100:30; 0	7	••	-	•	•	-	•	-	•	-	13	13	1	19	•	S. fradiae
8071	S-RA	Ol a Ov	Não cresceu	0	-	-	-	-	-	•	-	-	-	14	13	0	14	•	S. fradiae •
2573	RA	Ov	100:20; 0	12	-	-	-	•	-	•	-	-	-	26	26	5	26	•	S. fradiae
3042	RP-RA	Ol a Ov	100:15; 0	11	••••	-	•	•	-	•	-	•	-	7	2	0	7	•	S. fradiae ?
4096	S	•	100:15; 0	3	•••	••	•	•	-	•	-	•	-	0	5	0	20	-	S. fradiae
1505	RA	•	100:15; 0	11	-	••	•	•	•	•	•	•	-	25	2	2	7	•	?

getativo azul, violeta ou vermelho, com tôdas as "nuances" possíveis, necessitam de muito estudo antes que sua taxonomia se torne um processo seguro.

S. californicus (Waksman & Curtis, 1916) Waksman % Henrici, 1948.
Amostras 3029, 3055, 3095, 4008 e 4105.
CZ: 1. Branco-acinzentado; 2. Violeta, escuro ou claro; 3. Violeta, ± 42K9; 4. Ausente.
ML: 1. Branco-acinzentado ou ausente; 2. Violeta escuro; 3. Violeta escuro; 3. Violeta; 4. Ausente.
GA: 1. Branco-cinza; 2. Violeta ou marrom-vináceo; 3. Violeta; 4. Ausente.
BGA: 1. Branco-acinzentado ou ausente; 2. Violáceo; 3. Marrom-vináceo; 4 Ausente.
(Quadro IV).

Comentário: Essas culturas não concordam inteiramente com a descrição do *S. californicus* (Bergey's Manual, 1957; Krassilnikov, 1949) por não apresentarem espirais.

S. violaceoruber Waksman & Curtis, 1916.
Amostra 3011.
CZ: 1. Cinza-branco; 2. Azul-celeste, claro; 3. Azul, 38A12; 4 Azul, 39A12.
ML: Cinza-claro; 2. Cinza-esverdeado a vináceo claro; 3. Castanho-esverdeado; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza-Branco, 2. Vináceo a azul-celeste; 3. Azul, 39L12; Azul, 39L12.
BGA: 1. Cinza-azul; 2. Incolor; 3. Azul; 40J9; 4 Azul, 40J9.
(Quadro IV).

Comentário: Consultem o artigo de Kutzner & Waksman (1959); *S. violaceoruber* era tido como sinônimo de *S. coelicolor*. Aqueles autores, no artigo citado, demonstram serem duas espécies distintas.

S. violaceoruber (var. ?)

Amostra 4191.
CZ: 1. Cinza-azulado; 2 Incolor a azul-esverdeado; 3. Azul escuro; 4. Marrom-esverdeado, muito claro.
ML: 1. Azul, muito claro; 2. Creme; 3. Azul a castanho-esverdeado; 4. Leve escurecimento.
GA: 1. Azul claro acinzentado; elevado; colônias isoladas; 2. Azul, intenso; 3. Azul, 39L12; 4. Azul, 39L12.
BGA: 1. Cinza claro, azulado; 2. Incolor a azul; 3. Castanho-verde-azulado;
(Quadro IV).

Comentário: Esta cultura distingue-se da anterior por apresentar uma morfologia algo distinta (esporóforos às vêzes monoverticilados), produzir pigmento marrom em gelatina, fraca hidrólise de amido e algumas leves diferenças culturais.

S. coelicolor?
Amostra 4212
CZ: 1. Cinza, quase branco; 2. Amarelo claro, esverdeado; 3. Castanho claro, amarelado; 4. Amarelado.
ML: 1. Cinza; 2. Marrom-castanho; 3. Marrom-Arroxeado; 4. Marrom-avermelhado, claro.
BGA: 1. Cinza; 2. Ouro claro; 3 Vermelho-marrom, ± 8H8; 4. Vermelho-marrom, 8H8.
(Quadro IV).

Comentário: Esta cultura tem muito de comum com o *S. coelicolor* Müller (*sensu* Kutzner & Waksman, *op. cit.*, 1959).

Amostra 2309.
CZ: 1. Cinza-branco, escasso; 2. Violeta claro; 3. Azul-violáceo, 45C8; 4. Ausente.
ML: 1. Ausente ou branco-cinza, escasso; 2. Violeta: 3. Vináceo-marrom claro; 4. Apenas escurecimento.
GA: 1. Cinza-azulado; 2. Violeta. 3. Violeta, ± 45F6; 4. Violeta claro, pouco intenso.
BGA: 1. Azul-acinzentado; 2. Violeta claro; 3. Violeta escuro, ± 45F9; 4. Violeta escuro, ± 45F9.
(Quadro IV).

Amostra 2339.
CZ: 1. Cinza-róseo; 2. Violeta; 3. Roxo, ± 46G6; 4. Marrom-vináceo.
ML: 1. Cinza-violáceo; 2. Violeta; 3. Roxo, 46G6; 4. Apenas escurecimento.
GA: 1. Cinza-rosado; 2. Violeta; 3. Roxo, ± 46G6; 4. Apenas escurecimento.
BGA: 1. Cinza-violéceo; 2. Violeta; 3. Roxo, ± 46G6; 4. Marrom-avermelhado claro, pouco intenso.
(Quadro IV).

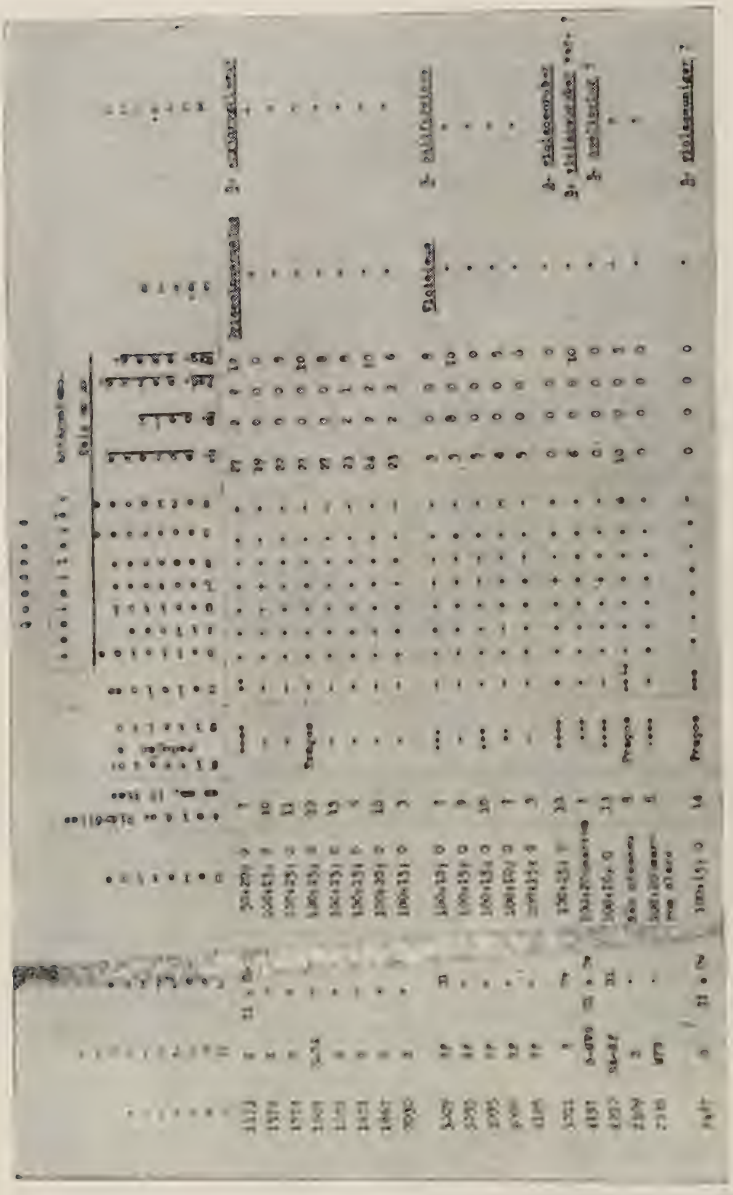
S. violaceoniger?
Amostra 2467.
CZ: 1. Cinza-fumo; 2. Incolor; 3. Incolor (violáceo-negro, 8A1, na base da estria); 4. Ausente.
ML: 1. Cinza, 6B7; 2. Violeta; 3. Violáceo-negro, 8A1; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza, 6B7; 2. Violeta; 3. Violáceo-negro, 8A1; 4. Ausente.
BGA: 1. Cinza, 6B7; 2. Violeta; 3. Violáceo-negro, 8A1; 4. Leve difusão violácea.
(Quadro IV).

Série *Albosporeus*

S. albosporeus (Krainsky, 1914) Waksman & Henrici, 1948
Amostra 2083.
CZ: 1. Branco; 2. Incolor, com pontos salmão; 3. Vermelho-violáceo; 4. Ausente.
CZ: 1. Branco; 2. Incolor, com pontos salmão; 3. Vermelho-violáceo; 4. Ausente.
GA: 1. Branco; 2. Salmão claro, 3. Salmão claro; 4. Ausente.
BGA: 1. Róseo-Branco; 2. "Salmon-pink", 10A8; 3. Vermelho-violáceo; 4. Ausente a levemente vermelho.
(Quadro IV).
Comentário: Distinções em relação ao *S. albosporeus* (Bergey's Manual, 1957): não hidrolisa amido; não reduz nitrato; não é antagonista.

Série *Cinereoruber* ?

S. cinereoruber?
Amostra 4107.
CZ: 1. Rosa-avermelhado; 2. "Coral red" 2110; 3. Vermelho; 4. Ausente.
ML: 1. Ausente ou cinza-branco; 2. Vermelho escuro, violáceo; 3. Vermelho-sangue; 4. Ausente.
BGA: 1. Róseo; 2. Róseo-violáceo; 3. Castanho com manchas vermelhas; 4. Ausente.
(Quadro V).



S. cinereoruber?
Amostra 4205.
CZ: 1. Cinza claro; 2. Rosa-vermelho, 2J7; 3. Vermelho-rosa; 4. Ausente.
ML: 1. Cinza-branco; 2. Rosa-violáceo; 3. Castanho; 4. Ausente.
GA: 1. Branco-acinzentado; 2. Laranja escuro; 3. Castanho-alaranjado; 4. Ausente.
BGA: 1. Cinza claro; 3. Rosa-violáceo; 3. Castanho-amarelado; 4. Ausente.
(Quadro V).

Série Flavoviridis

S. flavovirens (Waksman, 1923) Waksman & Henrici, 1948.
Amostras: 4005, 4095, 4130, 4203 e 4209.
CZ: 1. Cinza, 6B7 a 7A7; 2. Amarelo claro, esverdeado; 3. Esverdeado; 4. Verde claro ou ausente.

ML: 1. Cinza, 6B7 a 7A7; 2. Amarelo ou Marrom-amarelado; 3. Castanho a amarelo; 4. Amarelo.
GA: 1. Cinza-creme; 2. Amarelo-ouro; 3. Amarelo-marrom; 4. Amarelo.
BGA: 1. Cinza, 6B7 a ocre-cinza; 2. Castanho a amarelo; 3. Marrom ou amarelo; 4. Amarelo ou ausente.
(Quadro V).

Comentário: As amostras acima devem ser de uma única espécie, pois as diferenças entre elas são muito ligeiras. Enquadram-se nas descrições do *S. flavovirens* (Bergey's Manual, 1957) e do *A. flavoviridis* (Krassilnikov, 1949). Em nossa opinião são sinônimos; preferimos a primeira denominação por ser mais antiga. Se são realmente sinônimos a Série deve passar a *Flavovirens*, pelo motivo citado.

S. flavovirens var. I
Amostras 4133 e 4159.
Do ponto de vista cultural não diferem essencialmente das anteriores (a descrição acima serve para elas); porém sob o aspecto bioquímico se destacam: não assimilam rafinose; reduzem nitrato fortemente.

S. flavorirens var. II
Amostra 4208.
Mesma descrição das anteriores. Algumas diferenças bioquímicas. Deve ser no máximo uma variedade da espécie *S. flavovirens;* assim a consideramos.
(Quadro V).

Série *Flavus-Aureus*

Amostra 4124 e 4211
CZ: 1. Creme-cinza, 9C1; 2. Amarelo esverdeado; 3. Amarelo-ouro, escuro, 9L7; 4. Ausente ou amarelo.
ML: 1. Creme, 9C1 a 9C2 ,cotonoso; 2. Marrom-amarelado; 3. Marrom-amarelado; 4. Amarelo.
GA: 1. Creme-cinza, 9C1; 2. Amarelo-ouro; 3. Marrom-amarelo; 4. Amarelo.
GBA: 1. Amarelo com manchas cinzentas; 2. Amarelo a esverdeado; 3. Marrom amarelado; 4. Amarelo.
(Quadro V).

Comentário: Culturalmente lembram *S. xanthophaeus* Lindenbein, 1952 e *S. virgatus* (Krassilnikov, 1941) Waksman, 1953. O autor do primeiro não se refere a morfologia nem a assimilação, por exemplo, o que torna precária a descrição do *S. xanthopaeus* e dificulta nosso diagnóstico. O *S. virgatus* distingue-se por não produzir pigmento solúvel e não possuir atividade-

de antagonista. Por outro lado nossos culturas lembram o *S. flavus* (pela descrição no Bergey's 1957; pela de Krassilnikov, 1949, a espécie *S. flavus* está afastada).

Amostras 4090 e 4108.
CZ: 1. Cinza claro, 21A1; 2. Amarelo claro; 3. Incolor a castanho claro; 4. Ausente.
ML: 1. Ausente; 2. Creme-alaranjado; 3. Laranja claro; 4. Ausente.
GA: 1. Marrom-amarelado; 2. Castanho-amarelado a amarelo intenso; 3. Castanho-amarelado; 4. Ausente a amarelado.
BGA: 1. Cinza-marrom, 12A2; 2. Incolor a acastanhado; 3. Castanho-amarelado; 4. Ausente ou amarelado.
(Quadro V).

Comentário: Estas amostras lembram *S. graminearus* (*A. graminearus*) Berestnev 1897 (Krassilnikov, 1949) (descrição insuficiente) e também *S. celluloflavus* Nishimura et al., 1953.

Amostra 2445.
CZ: 1. Cinza, 6A1; 2. Incolor; 3. Castanho-amarelado; 3. Ausente.
ML: 1. Cinza, 6A1; 2. Amarelo; 3. Castanho-amarelado; 4. Amarelo-ouro.
GA: 1. Cinza, 6A1; 2. Creme; 3. Castanho-alaranjado; 4. Amarelo claro.
BGA: 1. Cinza, 6A1; 2. Amarelo; 3. Amarelo-castanho; 4. Amarelo.
(Quadro V).

Amostra 4024.
CZ: 1. Cinza-branco; 2. Incolor; 3. Creme (amarelo na base da estria); 4. Ausente.
ML: 1. Cinza-violáceo, claro, 4B1; 2. Marrom claro; 3. Castanho-amarelado; 4. Amarelo.
GA: 1. Cinza claro, cotonoso; 2. Castanho claro; 3. Castanho-amarelado; 4. Ausente.
BGA: 1. Cinza-violáceo, claro, 4B1; 2. Castanho-alaranjado; 3. Marrom escuro; 4. Marrom.
(Quadro V).

S. olivaceus (Waksman, 1923) Waksman & Henrici, 1948.
Amostras 3019, 3088 e 3092.
CZ: 1. Cinza escuro, 7A7; 2. Amarelo claro ou cinza-chumbo; 3. Cinza escuro; 4. Ausente.
ML e GA: 1. Cinza claro, quase ausente; 2. Amarelo-esverdeado; 3. Amarelo-esverdeado; 4. Ausente.
BGA: 1. Cinza escuro, 7A7; 2. Amarelo; 3. Castanho-amarelado; 4. Ausente.
(Quadro V).

Comentário: 3019 = *S. Olivaceus* ATCC 10636; 3088 = *S. aureofaciens* CBS (LJ); 3092 = *S. olivaceus* CBS (NRRL). Estas culturais se revelaram semelhantes sob todos os aspectos. Não seria justo, absolutamente, considerá-las espécies diferentes. Enquadram-se bem na descrição de *S. olivaceus*, exceto no que toca a antagonismo (as três estão atualmente inativas). Conclusão: ou a cultura 3088 foi erradamente classificada ou *S. aureofaciens* não passa de um sinônimo de *S. olivaceus*.

Amostra 2308
CZ: 1. Cinza claro a cinza-esverdeado; 2. Amarelo-esverdeado; 3. Marrom; 4. Marrom escuro.
ML: 1. Cinza-marrom, 6A8; 2. Amarelado; 3. Marrom claro.
GA: 1. Cinza ou marrom-acinzentado; 2. Amarelo claro; 3 Marrom; 4. Marrom claro.

Quadro 5

BGA: 1. Cinza-marrom, 6A8 a 14A3; 2. Incolor a castanho claro; 3. Castanho escuro; 4. Castanho-esverdeado.

Série *Albus*

Amostra 1923RF
CZ: 1. Branco-acizentado; 2. Incolor; 3. Incolor a castanho claro; 4. Ausente.
ML: 1. Branco-acinzentado; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
GA: 1. Branco; 2. Incolor; 3. Castanho claro; 4. Ausente.
BGA: 1. Branco-acinzentado; 3. Incolor; 3. Castanho claro; 4 Ausente. (Quadro VI).

Amostra 2463.
CZ: 1. Branco (colônias isoladas); 2. Incolor; 3. Creme a incolor; 4 Ausente.
CZ: 1. Branco (colônias isoladas); 2. Incolor; 3. Creme a incolor; 4. Ausente.
ML: 1. Branco a cinza-lavanda; flocoso; 2. Incolor; 3. Creme; 4. Ausente.
GA: 1. Branco (colônias isoladas); 2. Incolor; 3. Creme a castanho claro; 4. Ausente.
BGA: 1. Branco (colônias isoladas); 2. Incolor; 3. Castanho claro; 4. Ausente.
(Quadro VI).

Amostra 4057
CZ: 1. Branco-acinzentado; escasso; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
ML, GA e BGA: 1. Branco; 2. Incolor; 3. Incolor a castanho claro; 4. Ausente.
(Quadro VI).
Comentário: Rigorosamente não podemos considerar as três amostras acima como de uma única espécie; elas apresentam entre si diferenças morfológicas e bioquímicas acentuadas. Como as descrições do *S. albus* são acordes em apresentá-lo espiralado, a amostra 1923RF deve ser de espécie diferente. As duas outras se distinguem pela assimilação; talvez não seja correto incluí-las na mesma espécie.

Série *Viridis*

S. glaucus var. *achromogenes* n. var.
Amostra 2324
CZ: 1. Verde escuro, 24H1; 2. Incolor; 3. Incolor a esverdeado (na base da estria); 4. Ausente.
ML. 1. Verde escuro, 24H1; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
GA: 1. Branco e verde (parte superior da estria); 2. Incolor; 3. Incolor a creme; 4. Ausente.
(Quadro VI).

Comentário: A cêpa não concorda exatamente com a descrição do *S. glaucus* (Lehman & Shütze, 1912, *emend.* Krassilnikov, 1941) Waksman, 1953 (Bergey's Manual, 1957). Distingue-se por:
a. Não dar pigmento marrom em agar sintético (Czapek)
b. Não apresentar espirais típicas (é RA)
c. Hidrolisar amido muito fracamente
d. Não reduzir nitrato
e. Não crescer sôbre celulose.
Deve tratar-se de uma variedade fisiológica de *S. glaucus;* o micélio aéreo é, como o daquela espécie, bem típico na sua côr verde. Denominamos esta cultura *S. glaucus* var. *achromogenes* n. var.

S. viridochromogenes (Krainsky, 1914) Waksman & Henrici, 1948.
Amostra 1482.
CZ: 1. Azulado, 35A2; 2. Incolor; 3. Amarelado; 4. Ausente.
ML: 1. Cinza azulado, 45A3; 2. Incolor a castanho-esverdeado; 3. Castanho-esverdeado; 4. Ausente.
GA e BGA: 1. Cinza-azulado, 45A3; 2. Verde-lôdo; 3. Negro; 4. Verde-castanho.
(Quadro VI).

Comentário: Esta cêpa liquefaz galatina lentamente; hidrolisa amido muito fracamente; não reduz nitrato. Estas diferenças não são, porém, suficientes para separação de espécies.

Série *Rimosus*

S. olivochromogenes (Bergey et al., 1925) Waksman & Henrici, 1948.
Amostras 4194, 4195 e 4196.
CZ: 1. Marrom a cinza-lavanda, 5A8 a 4B7; 2. Incolor a côr de chumbo; 3. Incolor a castanho-amarelado; 4. Ausente.
ML: 1. Como em CZ; 2. Marrom a negro; 3. Marrom claro a escuro; 4. Amarelado.
GA: 1. Como em CZ; 2. Marrom a negro; 3. Marrom a negro; 4. Marrom escuro.
BGA: 1. Cinza-lavanda, 4B7, a creme; 2. Castanho; 3. Marron; 4. Marrom claro a amarelado.
(Quadro VI).

Comentário: Estas culturas enquadram-se bem na descrição da espécie; destacam-se apenas por não revelarem propriedades antagonistas.

Amostra 4200.
CZ: 1. Ausente a muito escasso e retardado; 2. Incolor, passando a amarelo-laranja; 3. Amarelado; 4. Ausente.
ML: 1. Marrom a cinza-lavanda, 5A8 a 4B7; 2. Marrom; 3. Marrom escuro; 4. Amarelado.
GA: 1. Como em ML; 2. Marrom-negro; 3. Marrom escuro; 4. Marrom.
BGA: 1. Cinza-lavanda, 4B7; 2. Castanho; 3. Marrom claro.

Comentário: A cêpa 4200 difere em alguns pontos importantes das anteriores. Exemplos: assimilação de compostos de carbono; desenvolvimento vegetativo em agar-Czapek (torna-se amarelo-laranja); micélio aéreo ausente ou escasso e retardado em agar-Czapek. Talvez esta amostra deva ser considerada de espécie diferente de *S. olivochromogenes*.

Série *Diastaticus*

S. griseus Krainsky, 1914 (não *S. griseus* Waksman & Henrici, 1948).
Amostras: 1671, 1698, 1827, 1899, 1907, 1923S, 2082, 2113, 2433, 2441, 3074, 4014, 4094, 4197, 4198, 4199.
CZ: 1. Cinza-chumbo, 5A7 a 6A7, ou com tonalidades pouco variando em tôrno dessas côres; 2. Incolor a creme; 3. Incolor a castanho claro; 4. Ausente.
ML: 1. Mais ou menos como em Czapek.
GA e BGA: 1. Como em CZ; 2. Incolor a creme; 3. Incolor, castanho ou marrom; 4. Ausente, raramente marrom claro.
(Quadro VII).

Comentário: Nossas amostras diferem em alguns pontos da espécie *S. diastaticus* (*A. diastaticus*), tanto pela descrição de Baldacci *et al.*, (1955), como pela de Waksman & Henrici, (Bergey's Manual, 1957). *A. diastaticus*,

1) Pigmento solúvel amarelo.

segundo Baldaci, não fluidifica gelatina ou o faz escassamente; segundo Waksman produz pigmento solúvel marrom a marrom escuro. Como se vê não é o caso presente. Nossas amostras concordam, porém, com a descrição do *A. griseus* Krainsky, dada por Krassilnikov (1949) e assim nós as consideramos.
As amostras 2443, 4045 e 4207 culturalmente se enquadram no grupo anterior; de outros pontos de vista, porém, elas se distinguem. As duas últimas talvez não possam ser consideradas *S. griseus* pela assimilação de carbono diferente; a 2443 destaca-se sobretudo pela morfologia: apresenta verticilos (veja-se *Comentário* seguinte). As cêpas 3010 e 4193, como as citadas, apenas diferem ligeiramente daquelas que nós consideramos *S. griseus* Krainsky.
(Quadro IX).

S. diastatochromogenes (Krainsky, 1914) Waksman & Henrici, 1948.
Amostras: 1447, 1478, 1641, 1652, 1667, 1948, 2291, 2342 e 4049.
CZ: 1. Cinza-marrom, 5B7, a cinza-branco; 2. Incolor; 3. Amarelo claro (em algumas amostras só na metade inferior da estria); 4. Ausente.
ML: 1. Cinza-marrom, 5B7, a cinza-branco; 2. Incolor a creme, a castanho claro; 3. Castanho claro a marrom claro; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza-marrom, 5B7, a cinza-branco; 2. Creme a amarelo claro; 3. Castanho claro a amarelado; 4. Ausente a amarelado.
BGA: 1. Cinza-marrom, 5B7, a cinza-branco; 2. Incolor, creme, ou castanho claro; 3. Castanho claro, amarelado, ou incolor; 4. Ausente ou amarelado.
(Quadro VIII).

Comentário: As cêpas 1478 e 2291 apresentam ramos espiralados formando verticilos primários. Entretanto, nem sempre os conidióforos se arranjam em verticilos; neste caso, achamos que a condição de apresentarem verticilados não justifica incluirmos estas culturas no gênero *Streptoverticillium* Baldacci; pois elas em tudo mais se comportam como as amostras do seu grupo.

Amostras 1746, 2084, 2311, 2318 e 2351.
Culturalmente não diferem muito das 9 amostras anteriores. Distinguem-se delas, entretanto, pelo reverso amarelo mais intenso (em agar-Czapek, principalmente) e pela ausência de pigmento marrom-café em gelatina. Não se trata de um grupo muito homogêneo, como se observará no quadro IV. Não nos foi possível determiná-las especificamente. Note-se que a cêpa 2351 apresenta verticilos.
(Quadro IX).

Comentário: Apesar de não ser possível um diagnóstico perfeito, pode ser notado que as amostras acima têm muito de comum com *S. cellulosae* (Krainsky, 1914) Waksman & Henrici, 1948. Não há dúvida ser esta a espécie mais próxima.

Série *Albidoflavus*

Amostra 2244.
CZ: 1. Branco ou ausente; 2. Incolor ou amarelado; 3. Amarelo claro ou verde (só em uma ocasião o desenvolvimento vegetativo tornou-se verde; em transplantes posteriores essa característica não voltou a aparecer); 4. Ausente ou verde (no caso acima referido).
ML: 1. Branco; 2. Incolor; 3. Incolor a creme; Ausente.
GA: 1. Ausente; 2. Incolor; 2. Incolor; 4. Ausente.
BGA: 1. Branco; 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
(Quadro VI).

Comentário: Esta amostra tem alguma relação com *S. alboflavus* (Waksman & Curtis, 1916) Waksman & Henrici, 1948, dêle diferindo em alguns aspectos, como liquefação de gelatina (já ao 15.º dia é total) e antagonismo (é inativo).

Série *Caeruleus*

Amostra 4210
CZ: 1. Azul claro, 41A2; 2. Incolor; 3. Incolor a castanho claro; 4. Ausente.
ML: 1. Cinza-azulado 44A4; 2. Bege; 3. Incolor a castanho claro; 4. Ausente.
GA: 1. Branco a cinza, claro, escasso; 2. Creme-amarelado; 3. Creme; 4. Ausente.
BGA: 1. Cinza-marrom, 6A8; 2. Incolor; 3. Castanho; 4. Ausente.
(Quadro VI).

Série *Griseus*

Amostra 2572.
CZ: 1. Esverdeado, aproximadamente 12B1, muito raso (micro-colônias); 2. Incolor; 3. Incolor; 4. Ausente.
ML: 1. Verde-cinza, 12C1; 2. Laranja; 3. Castanho; 4. Amarelado.
GA: 1. Marrom claro, 12B2; 2. Incolor a laranja claro; 3. Marrom claro; 4. Amarelado.
BGA: 1. Verde-cinza, 12C1; 2. Incolor; 3. Castanho; 4. Ausente.
(Quadro VI).

Comentário: Aceitando a espécie *S. griseus* Krainsky, 1914, como descreve Krassilnikov (1949) — e não temos motivos para não aceitá-la; nossas amostras classificadas como *S. griseus* Krainsky, 1914, se enquadram perfeitamente naquela descrição; representam um grupo homogêneo, diferente do *S. diastaticus* Krainsky, 1914, e do *S. griseus* Waksman & Curtis, 1916 — estamos impedidos de aceitar a Série *Griseus* Baldacci.
Não sabemos se Krassilnikov (1960) tem razão ao incluir a espécie de Waksman, a que êle chama *Actinomyces streptomycini*, no seu grupo *Globisporus;* não concordamos também com a denominação restritiva *A. streptomycini;* mas, por outro lado, achamos que a espécie de Waksman — que inclue representantes produtores de antibióticos e outros inativos — deveria receber novo nome.

Série: Não determinada

Amostras: 1514, 1568, 1759, 1872 e 3094.
CZ: 1. Cinza-fumo, 13A1; a cinza-marrom, 13A2; 2. Incolor; 3. Incolor a castanho claro, com escurecimento na base da estria (do 1872 é quase negro); 4. Ausente.
ML: 1. Cinza-marrom, 13A2 a 14A2; 2. Castanho ou incolor (do 1514 é laranja-rosado); 3. Castanho a marrom claro; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza, 13A1, a cinza-marrom 13A2 a 14A2; 2. Castanho claro ou rosa claro-alaranjado; 3. Marrom; 4. Marrom claro ou ausente (1568).
BGA: 1. Como em GA; 2. Castanho claro ou incolor; 3. Castanho a marrom claro; 4. Ausente, ou marrom claro-amarelado (1514).
(Quadro VIII).

Comentário: As culturas acima se relacionam com a Série *Diastaticus;* entretanto, não se enquadram perfeitamente nesta Série, pois o desenvolvimento vegetativo incolor (principalmente em glicose-agar e batata-glicose-agar) é exceção antes que regra geral.

Série: Não determinada

Amostra 4202
CZ: 1. Cinza-marrom, 14A2; 2. Laranja-esverdeado; 3. Laranja-amarelo, verde na parte superior da estreia; 4. Ausente.
ML: 1. Cinza-marrom, 14A2; 2. Laranja; 3. Castanho-amarelado; 4. Ausente.
GA: 1. Cinza-marrom, 14A2; 2. Laranja-vermelho; 3. Castanho, 14G5; 4. Ausente.
(Quadro VIII).

Comentário: Esta cultura tem características muito particulares. Tem o micélio vegetativo laranja-esverdeado ou laranja-vermelho, conforme o meio; e o micélio aéreo cinza; não produz pigmentos solúveis em meios orgânicos ou sintéticos (salvo uma leve pigmentação rosada em gelatina, a qual nem sempre aparece); tem hifas espiraladas; é fracamente proteolítica; cresce mal em celulose ou não se desenvolve; utiliza quase todos os compostos orgânicos aqui usados (apenas salicina é mal utilizada e sacarose é negativa); não é antagonista. Não conseguimos enquadrá-la taxonômicamente, nem sequer numa Série. Acreditamos tratar-se de espécie não descrita, sôbre a qual tencionamos fazer um trabalho em separado.

RESUMO

Numa tentativa para tornar mais acessível o estudo taxonômico do gênero *Streptomyces* os AA aplicaram a 115 culturas um método simplificado, constante de determinações morfológicas, culturais e bioquímicas.

A simplificação do método reside no número de meios de cultura empregados para o estudo cultural (êles são apenas quatro: Agar Czapek, Extrato de malte-extrato de levedura agar (Meio L), Glicose agar e Batata-glicose-agar); no emprêgo apenas de gelatina para a verificação da capaciddae proteolítica (os AA constataram que a peptonização de leite corre paralela com a liquefação de gelatina, sendo assim francamente dispensável o meio de leite); no uso de apenas sete compostos de carbono para a prova de assimilação: salicina, xilose, manitol, lactose, ramnose, sacarose e rafinose.

Muitas amostras — em grupos homogêneos ou isoladamente — foram diagnosticadas na categoria de espécies; muitas apenas puderam ser enquadradas em Grupos ou Séries; enquanto outras permaneceram sem possibilidade de diagnostico. Estas últimas, na opinião dos autores, são de difícil identificação mesmo que seja ampliado o método aqui seguido.

As amostras foram descritas dentro de um padrão uniforme, ficando tôdas perfeitamente caracterizadas.

SUMMARY

In an attempt to make the taxonomic study of the genus *Streptomyces* more accessible the authors applied to 115 strains a simplified method consisting of morphological, cultural and biochemical determinations.

The simplification of the method lies in the number of agar media employed (they are only four: Czapek's agar, Yeast extract agar, Glucose agar and Potato glucose agar); in the use only of gelatin to study proteolisis (the authors have found that peptonization of milk runs along with liquefaction of gelatin, the milk medium being dispensable); and in the use only of seven compounds to obtain the carbon utilization pattern; salicin, xylose, mannitol, lactose, rhamnose, sucrose and raffinose.

Many samples were identified as species; many others were classified only in Group or Series; and others were left without any possibility of identification.

The latter strains, in the opinion of the authors, are difficult to identify, even if the method here used be enlarged.

The strains were described according to an established pattern, being all of them well characterized.

ZUSAMMENFASSUNG

Um sich mehr Uebersicht im Studium der Gattung *Streptomyces* zu verchaffen, wendeten die Verf. eine vereinfachte Methode bei 155 Kulturen an wobei genannte Mehode aus morphologischen, zuechtungs und biochemischen Bedingungen bestand.

Die Vereinfachung des Verfahrens besteht in der Anzahl der Naehrmittel welche bei dem Studium der Kulturen angewendt wurden (es sind dies nur vier: Agar-Czapek, Malzextrakthefenextraktagar (Mittel L), Traubenzuckeragar und Kartoffel-Traubenzuckeragar); weiteres in der Anwendung von nur Gelatine zum Nachweis der proteolytischen Taetigkeit, (die Verf. stellten fest, dass die Peptonisation der Milch paralell mit der Verfluessigung der Gelatine verlaeuft und so sich das Mittel Milch als ueberfluessig erweist). Weiteres besteht das Verfahren in einer Anwendung von nur sieben Kohlenstoffverbindungen Fuer den Assimilationsnachweis und zwar: Salcyin, Xylose, Manitol, Milchzucker, Ramnose, Saccharose und Raffinose.

Viede Muster, — sei es in homogenen Gruppen oder vereinzelt — wurden als zu Arten gehoerig bestimmt, andere wieder wurden in Gruppen oder Serien eingereith waehrend bei anderen eine diagnostische Moeglichkeit ausblieb. Letztere sind nach Ansicht der Verf. schwierig zu identifizieren, dies sogar wenn die hier verfolgte Methode erweitert wird.

Die Muster, festgestellt oder nicht, wurden in einer einheitlichen Norm beschrieben wobei alle vollstaendig charakterisiert wurden.

REFERENCIAS

ANDRADE LYRA, F. D., M. F. DE ALBUQUERQUE, O. GONÇALVES DE LIMA, J. O. FALCÃO DE MORAIS & M. S. BISPO — Erigrisina — Um antibiótico produzido por *Streptomyces* (*S. erythrogriseus Morais* & D. Maia). *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, 2*: 99-107 (1959).

BALDACCI, E., C. SPALLA & A. GREIN — La classificazione delle specie di *Actinomyces* (*Streptomyces*). *Ann. Micr. 6*: 41-50 (1954).

BALDACCI, E., C. SPALLA & A. GREIN — Studio di una "Serie" di specie di Actinomiceti: *A. diastaticus. Giorn. Microbiol. 2*: 127-43 (1955).

BALDACCI, E. — Development in the classification of Actinomycetes. *Ibid. 6*: 10-27 (1959).

BENEDICT, R. G., T. G. PRIDHAM, L. A. LINDENFELSER, H. H. HALL & R. W. JAKSON — Further studies in the evaluation of carbohydrate utilization tests as aids in the differentiation of species of *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. 3*: 1-6 (1955).

BREED, R. S., E. G. D. MURRAY, N. R. SMITH, *et al* — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Co. Baltimore (1957).

DUCHE, J — Les *Actinomyces* du groupe *Albus*. Enciclopédie Mycologique, Paris, VI (1934).

KRASSILNIKOV, N. A. — Guide to the identification of Bacteria and Actinomycetes. Acad. Sci., Moscow (Traduzido para o inglês por J. B. ROUTIEN, U.S.A. ,1957).

KRASSILNIKOV, N. A. — Taxonomic principles in the Actinomycetes. *Jour. Bacteriol. 79*: 65-74 (1960).

KUTZNER, H. J. & S. A. WAKSMAN — *Streptomyces coelicolor* Mueller and *Streptomyces violaceoruber* Waksman and Curtis, two distinctly different organisms. *Jour. Bacteriol. 78*: 528-38 (1959).

MAERZ, A. & M. REA PAUL — A Dictionary of Color. 2nd Ed., McGraw-Hill Co., Inc. (1950).

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, M. H. DÁLIA MAIA & M. E. GENN — Um estudo taxonômico em tôrno do *Streptomyces lavendulae* — *S. lavendulae* var. *brasilicus* n. var. *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, 1*: 69-87 (1958).

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, M. H. DÁLIA MAIA & M. E. GENN — Sôbre uma variedade de *Streptomyces* comum nos solos do Brasil: *S. venezuelae* var. *roseospori* n. var. *Ibid. 1*: 99-106 (1958a).

MORAIS, J. O. FALCÃO DE & M. H. DÁLIA MAIA — *S. erythrogriseus*: Novo *Streptomyces* produtor de antibiótico. *Ibid. 2*: 63-7 (1959).

NAMYSLOWSKI, B. — Beitrag zur Kenntnis der menschlichen Hornhautbakteriosen. *Centr. f. Bakt.* I Abt. Orig., *62*: 564-8 (1912).

PRIDHAM, T. G. & GOTTLIEB, D. — The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetales* as an aid for species identification. *Jour. Bacteriol.*, *56*: 107-14 (1948).

PRIDHAM. T. G., C. W. HESSELTINE & R. G. BENEDICT — A guide for the classification of Streptomyces according to selected groups. *Appl. Microbiol. 6*: 52-79 (1958).

SHIMO, M., T. SHIGA, T. TOMOSUGI & I. KAMOI — Studies on Taitomycin, a new antibiotic produced by *Streptomyces sp.* n.º 772 (*S. afghaniensis*). I. *J. Antibiotics* (Japan) Ser. A-XII (i). 1-6 (1959).

WAKSMAN, S. A. & H. A. LECHEVALIER — Actinomycetes and their antibiotics. The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1953).

O. Gonçalves de Lima, M. H. Dália Maia, I. Leôncio d'Albuquerque, M. Machado F. de Albuquerque & M. A. Pereira Borba

Substâncias antimicrobianas de plantas superiores

Comunicação XVI. Estudo de antimicrobianos cristalizados, obtidos da madeira de jacarandá (*Dalbergia nigra*) [*Leguminosae*] (*)

São apresentados novos resultados em continuação a uma pesquisa anterior (Gonçalves de Lima, Machado de Albuquerque & Dália Maia, 1959) sôbre os constituintes do cerne da madeira jacarandá (*Dalbergia nigra*), com ação antimicrobiana. São estudados nesta oportunidade, dois antitbióticos cristalizados, um dêles com PF 109,2 — 109,5° C, que denominamos *dalbergiona I*, e outro com PF 125,7 — 126,5° C, que denominamos *dalbergiona II*, cujas propriedades os incluem no grupo dos compostos quinonóides.

Conforme foi demonstrado em publicação anterior, extratos aquosos, metanólicos ou acetônicos de amostra da madeira jacarandá (*Dalbergia nigra*), apresentam considerável atividade antibiótica, tanto nas provas de disco, como na de Waksman & Reilly (1945) contra Gram-positivos, Gram-negativos, ácido-resistentes e determinados fungos. Também se verificou que resíduos sêcos de extratos acetônicos ou alcoólicos antes de qualquer purificação, apresentam atividades excepcionais contra

Bacillus anthracis	—	(10 — 20 mcg/ml)
Brucella melitensis	—	(10 — 20 mcg/ml)
Proteus morganii	—	(10 — 20 mcg/ml)
Candida stellatoidea	—	(20 — 40 mcg/ml)
Nocardia asteroides	—	(20 — 40 mcg/ml)

Em ensaios preliminares conduzidos pelo comportamento papirográfico em cromatograma sumário, foi constatada a existência de pelo menos três princípios antimicrobianos os quais se obtiveram posteriormente em estado cristalizado, todos com um comportamento químico e mesmo biológico que parece situá-los no importante grupo das quinonas naturais.

Do ponto de vista biológico, ao lado de outras valiosas propriedades, destacam-se as antimicrobianas, dos derivados de benzo - e naftoquinonas, conforme observações mais antigas de Morgan & Copper (1921), sobretudo

(*) Apresentado a 7 de novembro de 1961 na III Reunião Anual, "Estrutura de Substâncias Naturais", da Associação Brasileira de Química — Secção Regional da Guanabara, sob o título: "Quinonas naturais com ação antimicrobiana".

como compostos entre os quais sobressaem alguns por uma apreciável atividade anti-*Brucella* conforme foi pôsto em relêvo por Del Vecchio *et al*, (1946), com a ação da menadiona e alguns dos seus derivados.

Um exemplo muito adequado se encontra no lapachol, o qual, como tivemos oportunidade de assinalar em publicação anterior (Gonçalves de Lima *et al*, 1956), apesar de possuir uma débil ação contra os Gram-negativos mais comuns, tem uma relevante ação anti-*Brucella* (3,4 a 4,7 mcg/ml).

Recentemente, têm despertado a atenção dos pesquisadores as possibilidades que pode oferecer uma investigação sôbre o papel que tais substâncias naturais desempenham como antifúngicos e antibacterianos e até mesmo como anti-termitas na natural resistência de certas madeiras aos seus agentes mais comuns de destruição, o que em certos casos tem sido atribuído à presença de derivados ativos estilbênicos, quinônicos e pirânicos (Sandermann & Dietrichs 1957).

A ocorrência de antibióticos com estrutura quinônica se observa com ampla distribuição em a natureza, a exemplo dos de origem microbiana como os derivados da toluquinona; fumigatina (3-hidroxi-4-metoxi-toluquinona), spinulosina (6-hidroxifumigatina) e outros; do ftiocol (3-hidroxi-2-metil-1:4-naftoquinona) e derivados de antraquinona, inclusive o ácido crisofânico (1,8-dihidroxi-3-metilantraquinona) isolado por Raystrick (1950) de cultivos de *Penicillium islandicum*. Também são numerosos os compostos isolados de vegetais superiores, desde a singela juglona da nogueira (5-hidroxi-1:4-naftoquinona), à relativamente complexa biflorina (ortoquinona policíclica) por nós descoberta na *Capraria biflora* (Gonçalves de Lima *et al*, 1953).

A ação antibacteriana de ácidos antraquinone-2-carboxílicos mono-substituídos, tais como 1-hidroxi-antraquinona-2-carboxílico e os correspondentes amino- e nitroderivados, foram provados por Boross & Ferenczy (1961), porém nenhum dêles se mostrou efetivo, nas condições experimentais (difusão horizontal em agar), contra os Gram-negativos mais característicos (*E. coli dyspepsiae* O_{111}, *Proteus vulgaris* X_{19}, *Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens* e os fungos como *Candida albicans*); em relação aos Gram-positivos foi verificada a superioridade do 1-amino-derivado sôbre os demais, porém sempre inferior à reína ou ácido cássico (1,8-dihidroxi-antraquinona-3-carboxílico), isolado por Robbins, Kavanagh & Thayer (1947) das fôlhas de *Cassia reticulata*, usada na medicina popular de Costa Rica contra infecções por *Neisseria gonorrheae*.

Ademais de suas propriedades antimicrobianas, foi observada por Lehmann (1942) ação antimitótica de diversas quinonas em ovos de *Tubifex*, o que foi comprovado posteriormente por Meier & Algoewer (1945) utilizando 1,2-benzantren-3,4-quinona em cultivos de fibroblastos de *Gallus domesticus*, com resultados superiores aos logrados com feniluretana e colchicina.

Derivados quinônicos sintéticos com relevante ação citostática foram logrados por Gauss & Peterson (1955).

A presente comunicação, seguindo-se à citada referência publicada anteriormente sôbre atividade de extratos de certas madeiras do país, dá con-

ta dos trabalhos de isolamento, purificação, características antimicrobianas e fisicoquímicas de duas entre outras substâncias ativas existentes no jacarandá.

As substâncias que denominamos *dalbergiona I* e *dalbergiona II,* com evidentes propriedades quinonóides, apresentaram mesmo se obtidas sem qualquer cuidado de evitar agressão térmica, atividades semelhantes ou superiores a alguns outros antibióticos do mesmo grupo, conseguidos também de plantas superiores, tais como: timoquinona (2-metil-5-isopropil-1:4-benzoquinona) de *Tetraclinis articulata* e de *Monarda fistulosa;* juglona *de Juglans nigra* e *J. regia; plumbagina* (5-hidroxi-2-metil-1:4-naftoquinona) de várias espécies de *Plumbago;* pristimerina, ortoquinona policíclica da *Pristimera indica* e *Pr. grahani* (*Celastraceae*) (Kulkarni & Shah, 1954; Kakanish, Kakisawa & Hirata, 1955).

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO

Ensaios preliminares demonstraram que o extrato ligroínico da serragem sêca ao ar apresenta atividade antibiótica, em parte oriunda de duas substâncias fàcilmente cristalizáveis que permanecem na fase orgânica quando esta é tratada até esgotamento por solução aquosa de carbonato de sódio a 5% (*).

Também se obtém um produto heterogêneo bastante ativo ao tratar-se por etanol e acetato de etila o resíduo sêco da evaporação do extrato acetônico (a frio) e eliminando-se os constituintes precipitáveis por éter de petróleo. O material conseguido pela evaporação do sobrenadante sendo triturado em presença de acetato de etila puro, resulta em um resíduo amarelo e cristalino que, sem mais purificação ofereceu uma forte atividade antimicrobiana (quadro I), sobretudo contra *Bacillus anthracis* (4 — 6 mcg/ml).

QUADRO I

Atividade do resíduo bruto cristalino, obtido a partir de extrato acetônico, segundo método descrito no texto

MICRORGANISMOS	substância bruta mcg/ml
Staphylococcus aureus	8,0 — 10,0
Bacillus subtilis 9	10,0 — 12,0
Bacillus anthracis	4,0 — 6,0
Streptococcus hemolyticus	100,0
Candida kruzei	100,0
Candida albicans	100,0
Mycobacterium smegmatis	100,0
Brucella abortus	80,0 — 100,0
Polystictus sanguineus	200,0

(*) Uma terceira substância cristalizada de PF 166,2/168,5°C foi obtida pela primeira vez por nós de extrato benzênico da serragem do Jacarandá prèviamente esgotado por ligroína; em outra oportunidade u'a amostra de substância semelhante apresentou PF bastante mais elevado (220,8°/221,6°C).

A solução em acetato de etila que também se mostrou bastante ativa, forneceu por precipitação fracionada com éter de petróleo, novas amostras que apesar de semelhantes, se distinguem pela ação contra *Mycobacterium smegmatis*, *Brucella abortus* e *Candida spp.* (quadro II). Os primeiros isolamentos realizados foram conduzidos por tratamentos a frio de amostra de madeira recentemente colhida na região de Itabuna (Bahia) de maneira a obter-se nos produtos finais o máximo de atividade, os quais em certos casos, apresentaram sem qualquer purificação, a excepcional atividade de 6 a 8 mcg/ml para *Staphylococcus aureus*.

Como método preparativo foi utilizada a extração da serragem sêca (8 kg) por éter de petróleo a quente, tendo-se no entanto o máximo cuidado em conduzir as operações, sobretudo quando em solução de éter de petróleo, sempre ao abrigo da luz natural, mesmo difusa.

O extrato evaporado a sêco e tratado por benzeno, deixou um resíduo inativo que foi descartado. O material solúvel em benzeno, foi tratado por solução de carbonato de sódio a 5% repetidas vêzes, separando-se na fase aquosa uma substância sólida, amorfa, de côr branco-rosa nacarada, que se comporta como flavonóide.

A fase benzênica lavada repetidamente com água foi a seguir tratada por água ácida (pH 2,0), reservando-se a fração aquosa de côr amarela. A fase benzênica, mais uma vez lavada com água, foi tratada por SO_4Na_2, filtrada e evaporada. O extrato sêco foi redissolvido em pequena quantidade de benzeno, juntando-se depois ligroína até turvação, deixando-se o material em refrigerador algum tempo.

Houve formação de precipitado liquido pardo-avermelhado, com deposição de cristais na camada superior. Ao sobrenadante separado por decantação, adicionou-se mais éter de petróleo e guardou-se durante algumas horas em refrigerador, resultando u'a abundante cristalização, constituida de dois grupos de cristais, amarelos e laranja, além de u'a massa subjacente, graxa, parda escura.

QUADRO II

Atividade dos precipitados obtidos de acetato de etila por éter de petróleo (J_1, J_2, J_3) (para valores crescentes da concentração de éter de petróleo).

MICRORGANISMO	concentração mínima de inibição (em mcg/ml)		
	J_1	J_2	J_3
Staphylococcus aureus	8,0 — 10,0	8,0 — 10,0	10,0 — 12,0
Bacillus subtilis 9	10,0 — 12,0	12,0 — 15,0	10,0 — 12,0
Bacillus anthracis	6,0 — 8,0	6.0 — 8,0	10,0 — 12,0
Streptococcus hemolyticus	60,0 — 80,0	60,0 — 80,0	60,0 — 80,0
Candida kruzei	100,0	80,0 — 100,0	100,0
Candida albicans	100,0	60,0 — 80,0	100,0
Mycobacterium smegmatis	80,0 — 100,0	40,0 — 60,0	40,0 — 60,0
Brucella abortus	18,0 — 20,0	40,0 — 60,0	30,0 — 40,0
Polystictus sanguineus	100,0 — 200,0	100,0 — 200,0	

O sobrenadante foi evaporado a sêco repetindo-se com o resíduo as operações anteriores. Os precipitados cristalinos reunidos, foram lavados exaustivamente com etanol a 60% o qual removeu o material amorfo pardo, restando os cristais que se dissolveram posteriormente em benzeno, adicionando-se em seguida éter de petróleo até turvação. Os cristais formados após permanência da mistura em refrigerador, se constituiam predominantemente do compôsto de côr laranja que por separação e cristalização, logo atingiram PF 108-109°C.

QUADRO III

Jacarandá (*Dalbergia nigra*)

Espectro antimicrobiano de Dalbergiona I (PF 108,5 — 109,2° C)

MICRORGANISMO	concentração mínima de inibição (mcg/ml)
Bacillus subtilis 27	15,0 — 20,0
Bacillus subtilis 9	15,0 — 20,0
Bacillus mycoides	20,0 — 30,0
Bacillus anthracis	20,0 — 30,0
Staphylococcus aureus W	10,0 — 15,0
Staphylococcus aureus ATCC	15,0 — 20,0
Micrococcus citreus	10,0 — 15,0
Sarcina lutea	10,0 — 15,0
Streptococcus hemolyticus	15,0 — 20,0
Myc. tub. v. hominis 607	100,0
Mycobacterium smegmatis	60,0 — 80,0
Mycobacterium phlei	60,0 — 80,0
Brucella suis ATCC	30,0 — 40,0
Brucella abortus ATCC	20,0 — 30,0
Brucella melitensis ATCC	30,0 — 40,0
Cryptococcus neoformans ENCB	80,0 — 100,0
Cryptococcus neoformans IHM	60,0 — 80,0
Candida kruzei	80,0 — 100,0
Candida albicans	80,0 — 100,0

No sobrenadante se acumulou um produto misto amarelo-canário de PF 110 — 111°C (4,5 g) de fastidiosa disjunção em seus constituintes, pelo que, foi tentada a partição Craig, escolhendo-se o sistema ligroína (Merck 60-80°C): metanol: água (10:10:0,6) com 42 passagens, observando-se que o componente principal, amarelo, se reuniu nos tubos 4 a 10. O material obtido da faixa correspondente ao cimo, depois de cristalizado de etanol absoluto, ofereceu ainda características de heterogeneidade. A atividade desta fração é apresentada no quadro IV, sendo de notar a sua ação contra *Brucella melitensis* e *Cryptococcus neoformans*. Neste caso, apesar de ser a operação conduzida em recinto de pouca luminosidade, utilizando-se o sistema já referido, verificamos u'a modificação apreciável de parte do produto, constatada tanto pelos pontos de fusão das frações separadas, como pelo aparecimento de um derivado pardo avermelhado de árdua eliminação

QUADRO IV

Atividade da fração de PF 110 — 111°C

MICRORGANISMO	concentração mínima de inibição (mcg/ml)
Bacillus subtilis 9	8,0 — 10,0
Bacillus anthracis	6,0 — 8,0
Bacillus cereus	15,0 — 20,0
Staphylococcus aureus	8,0 — 10,0
Micrococcus citreus	8,0 — 10,0
Sarcina lutea	8,0 — 10,0
Streptococcus hemolyticus	±50,0
Escherichia coli N	100,0
Shigella p. dysenteriae	100,0
Salmonella typhosa	100,0
Klebsiella typhosa	100,0
Neisseria catarrhalis	25,0 — 30,0
Brucella melitensis	15,0 — 20,0
Mycobacterium humanus	15,0 — 20,0
Nocardia asteroides	15,0 — 20,0
Candida stellatoidea	20,0 — 25,0
Cryptococcus neoformans	20,0 — 25,0

Problema semelhante parece ter ocorrido com Weiss & Nord (1949) durante as primeiras tentativas de isolamento e purificação da solaniona por partição entre solventes.

Entre outras causas de insucesso na separação e purificação de quinonas no trabalho de partição, pode ser relevante, em certos ambientes iluminados, a ação da luz natural difusa, em presença de determinados solventes, os quais agem então como doadores de hidrogênio (tais como clorofórmio, éter de petróleo, iso-octano, etc.), fato observado desde 1886 por H. Klinger *et al*, e estudado por G. Ciamician e P. Silber na mesma época, com interessante comunicação publicada em 1902.

Em certos casos, parece que a sensibilidade à luz é excepcional, a exemplo da muscarrufina, da *Amanita muscaria* cuja labilidade foi posta em relêvo por Koegl & Erxleben (1930).

Arnstein & Cook (1947) observaram que a javanicina (5,8-dihidroxi-6-acetonil-1,4-naftoquinona) em soluções muito diluídas, e prolongada exposição à luz, perde a côr e atividade antibacteriana. O fenômeno foi analisado posteriormente em profundidade por L. Paoloni e Marini-Bettòlo (1957) sendo de interêsse reproduzir aqui a sua judiciosa observação ao referirem que "muitas das chamadas desidrogenações térmicas vêm sendo efetuadas sem o cuidado da ausência de luz, e que o éter de petróleo é usado largamente para diluir as misturas reagentes, para eluir colunas cromatográficas, etc." (*ibid.* pág. 399), ao que nós ajuntamos a importância que tal ação da luz tem necessàriamente na formação de derivados que falseam os resultados analíticos e preparativos, quando certas opera-

ções, mesmo as mais ràpidamente efetuadas, como a dissolução das amostras em certos solventes, se realizam em ambiente iluminado por luz natural.

SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES PRINCIPAIS DA FRAÇÃO AMARELA DE PF 110 — 111°C

Como um excelente meio de separação dos constituintes da referida fração amarela (PF. 110 — 111°C), usamos uma coluna de silicagel (Merck 0,05-0,20 mm) parcialmente desativada por água (10%), segundo a técnica de Barua & Morton (1949) e o sistema éter de petróleo: benzeno (8:2), desenvolvendo-se durante 16 h, ao abrigo da luz.

Formaram-se duas faixas nìtidamente separadas por uma região intermediária, as quais se distinguiam por suas côres: a banda de velocidade de migração maior, a inferior, de côr amarela pálida; a superior de côr laranja vivo. Observou-se que a primeira faixa inferior se encontrava contaminada de um componente dotado de maior mobilidade. O produto misto obtido, de PF 116°C foi recromatografado no mesmo suporte e igual sistema, logrando-se afinal uma substância com PF 125 — 126°C, valor que se manteve constante depois de novas operações de purificação.

QUADRO V

Jacarandá (*Dalbergia nigra*)

Espectro antimicrobiano de Dalbergiona II (PF 125 — 126°C)

MICRORGANISMO	Concentração mínima de inibição (mcg/ml)
Bacillus subtilis 27	15,0 — 20,0
Bacillus subtilis 9	15,0 — 20,0
Bacillus mycoides	20,0 — 30,0
Bacillus anthracis	20,0 — 30,0
Staphylococcus aureus W	30,0 — 40,0
Staphylococcus aureus ATCC	50,0 — 60,0
Micrococcus citreus	15,0 — 20,0
Sarcina lutea	40,0 — 50,0
Streptococcus hemolyticus	20,0 — 25,0
Myc. tub. v. hominis 607	50,0 — 60,0
Mycobacterium smegmatis	30,0 — 40,0
Mycobacterium phlei	30,0 — 40,0
Brucella suis ATCC	20,0 — 25,0
Brucella abortus ATCC	25,0 — 30,0
Brucella melitensis ATCC	25,0 — 30,0
Cryptococcus neoformans ENCB	60,0 — 80,0
Cryptococcus neoformans IHM	60,0 — 80,0
Candida kruzei	80,0 — 100,0
Candida albicans	80,0 — 100,0

MÉTODO SIMPLIFICADO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS DUAS SUBSTÂNCIAS

Dalbergiona I e Dalbergiona II

Foi posteriormente adotado o seguinte método de isolamento e purificação das duas substâncias ativas do extrato ligroínico:

O extrato ligroínico sêco, é retomado em pequeno volume de acetona e evaporado a xarope. O xarope obtido é tratado em excesso por CO_3HNa. À massa resultante adiciona-se sulfato de sódio anidro e deixa-se em dessecador a vácuo por algumas horas. Extrái-se em Soxhlet com éter de petróleo (faixa de ebulição 40 — 60°C). O extrato ligroínico é então tratado por CO_3Na_2 (5%) para retirar algum resíduo de substâncias acídicas, lavando-se em seguida com água. O extrato sêco é então retomado em benzeno, juntando-se ligroína até turvação. A mistura é deixada em refrigerador até precipitação de uma fase de aspecto graxo. Repete-se esta operação até eliminar a citada substância. O sobrenadante evaporado até sêco, apresenta-se como u'a massa cristalina laranja avermelhada, que se cromatografa em coluna de silicagel desativada parcialmente, em coluna livre de bolhas de ar, segundo a técnica recomendada por Neher (1959). O desenvolvimento do cromatograma se faz pelo sistema éter de petróleo: benzeno (9:1), ao abrigo da luz, verificando-se rápida percolação de uma faixa amarelo-canário, correspondendo a uma fração de consistência oleosa sem atividade apreciável, que foi descartada.

A diversificação muito nítida das três bandas de migração ocorre antes de 20 horas, de maneira bem definida: a primeira, pardo-avermelhada; a segunda, de côr laranja-avermelhada; a terceira, amarelo-laranja.

As substâncias obtidas por eluição das duas últimas faixas, respectivamente por acetona e por benzeno, foram cristalizadas, usando-se clorofórmio: n-heptano para a primeira, e benzeno: éter de petróleo para a segunda, ao abrigo da luz.

Estas duas substâncias que denominamos *Dalbergiona I* e *Dalbergiona II* se distinguem dèbilmente por seu comportamento papirográfico ascendente, com o sistema ácido fórmico (Riedel-de Haeen A-G 98-100%): éter de petróleo (40 — 70°C) (1:4), $R_{f_I} = 0,34$; $R_{f_{II}} = 0,37$. No sistema modificado, de ácido fórmico: éter de petróleo (1:4) (0,5% de benzeno na epifase utilizada): $R_{f_I} = 0,82$; $R_{f_{II}} = 0,94$. Foi empregada, como reativo detector, potassa alcoólica a 5%, observando-se para I a côr verde-musgo e para II, violeta-azulada.

U'a amostra de I foi submetida a mais duas cromatografias no mesmo suporte e sistema, sendo recristalizada três vêzes em etanol e uma vez de benzeno: n-heptano, verificando-se um PF de 109,2 — 109,5°C, em tubo capilar Kimble (Kimble Glass Company, 34505: 1.5 — 2.0x90 mm). Esta amostra foi recromatografada no mesmo sistema, comportando-se durante as 17 horas da operação como uma faixa pura de côr amarelo-laranja (Pl 10: L 6, Dictionary of Color, Maerz and Paul, 1950), observada a sêco. A substância foi eluída com acetona e recristalizada de benzeno: n-heptano, apresentando o mesmo ponto de fusão.

O segundo composto (substância II), depois de isolado por cromatografia e cristalização de etanol, foi recristalizado três vêzes no mesmo solvente, mantendo-se o PF em derredor de 125,7-126,2°C. A faixa cromatográfica correspondente a esta substância na coluna de sílica-gel, oferece depois de sêca a côr amarela (Pl 9; L-1).

O primeiro composto, depois de recristalizado de clorofórmio: n-heptano e lavado por etanol a 96%, apresentou-se como belos cristais em prismas hexagonais de côr âmbar-laranja (fotos 1 e 2) cuja análise corres-

Foto 1

ponde à fórmula $C_{17}H_{16}O_4$. Volátil em vapor dágua. Solúvel nos solventes orgânicos como clorofórmio, benzeno, acetona: pouco solúvel em metanol e etanol. Muito pouco solúvel em éter de petróleo. Pràticamente

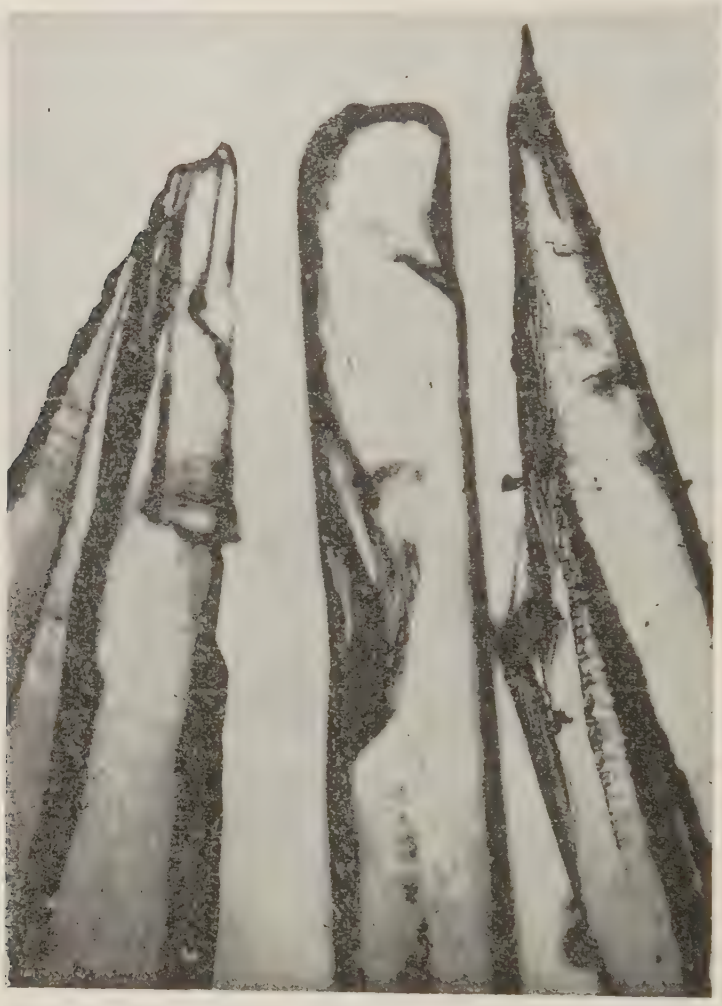


Foto 2

insolúvel em água. Solúvel em ácido sulfúrico concentrado, com desenvolvimento de côr castanha escura que passa a vermelho-púrpura. Em ácido nítrico concentrado dissolve-se mantendo a côr da própria substância. Dissolve-se muito lentamente em solução de soda a 5% a frio, com côr salmon clara, que se intensifica a quente. Com cloreto de ferro, nenhuma mudança de côr. Os agentes redutores o descoram ràpidamente em suas soluções alcoólicas as quais, deixadas ao ar, retomam lentamente a primitiva côr. Liberta iodo de soluções de iodeto de potássio. Não se dissolve em bissulfito de sódio aquoso. Prova de acetato de níquel, negativa. Com aceto-acetato de etila, sua solução etanólica apresenta por adição de amônia, côr azul-esverdeada (Macbeth, Price & Winzor, 1935). A reação de Ionescu, Kesting (1928, 1928a, 1929) e Craven (1931) com o ciano-acetato

de etila e amônia alcoólica foi atípica (coloração imediatamente verde-musgo que se intensifica posteriormente). Solução de anidrido acético + SO_4H_2, côr vermelho-cereja, passando a vermelho-fucsina. Tollens, positivo. Benedict, duvidoso. 2,4-dinitrofenilhidrazina, precipitado. Schiff, negativo. A côr laranja da solução alcoólica não se modifica por ação breve de ácido diluído, passando no entanto de imediato ao azul-violeta por soda a 5%. O comportamento da substância na prova de Bamberger (1884, 1885) não ofereceu diferença para o anterior. Observa-se que substituindo na reação anterior a solução de soda diluída por amônia:etanol (1:1) da reação de Craven (1931) ocorre — não de imediato, porém depois de vários segundos — côr violeta-azulada clara. Descora a solução de bromo em tetracloreto de carbono (reação relativamente lenta), com emissão débil mas perceptível de BrH na fase final.

Seu espectro ultravioleta apresenta máximos em 228 mu e 251 mu com inflexão em um entôrno de 345 mu (fig. 1).

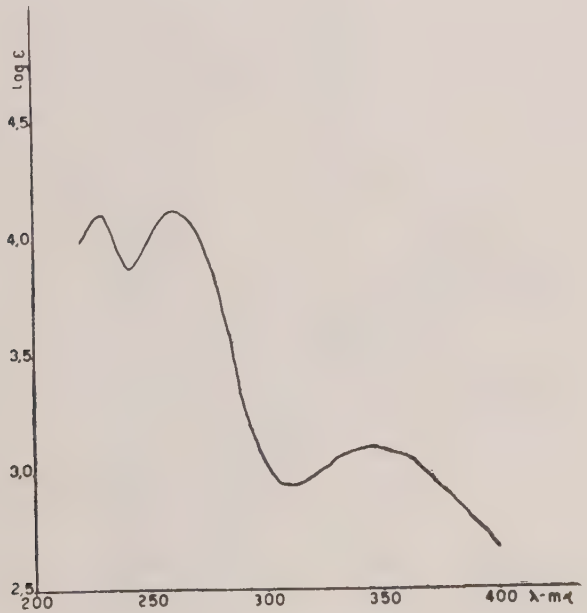


Fig. 1

Na região do infravermelho as bandas de carbonila de absorção máxima são presentes (5,98 u; 6,07 u) (fig. 2), (Randall et al, 1961).

O seu comportamento perante soluções diluídas aquosas de álcalis e as provas negativas de cloreto de ferro e acetato de níquel, estão em consonância com a ausência de banda oxidrila nas imediações de 3 u (2,8 u).

Não foi logrado produto acetilado pelo método que usaram Weiss & Nord para a solaniona (*ibid.* pág. 307). Por acetilação sob condições redutoras (Brockmann & Budde, 1953) origina-se um di-acetil-dihidro-derivado cor-

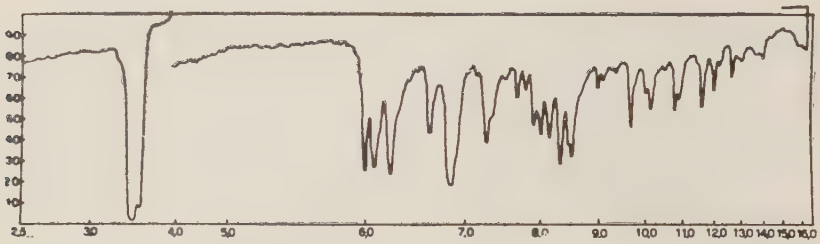


Fig. 2

respondendo a $C_{21}H_{22}O_6$. O espectro UV do produto acetilado é apresentado na fig. 3.

A existência do grupo metoxi é demonstrada pela presença de metanol (prova de Eegriwe & Feigl, 1957) nos destilados por arraste a vapor dos produtos de hidrólise alcalina e corroborada quantitativamente pelo método de Vieboeck & Schwappach, com resultados que indicam a presença de dois grupos CH_3O.

Com o-fenileno-diamina não se conseguiu pelo método usado anteriormente (Prelog *et al*, 1958) lograr um produto cristalizado com características de derivado quinoxalínico.

O comportamento da sua solução diluída, em éter de petróleo Merck, faixa de ebulição 40-60°C) à luz solar se caracteriza por rápido descoramento (60 minutos) com precipitação de produto de côr amarelo-pálida,

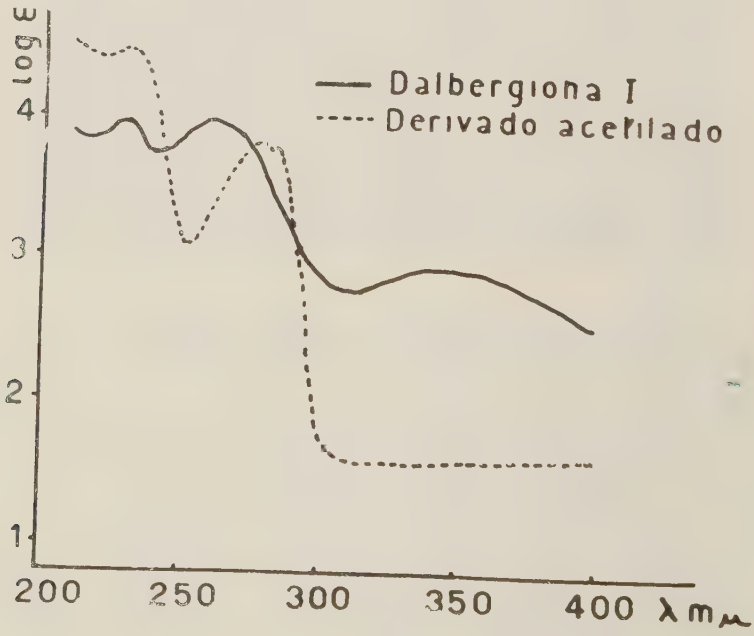


Fig. 3

o qual apresentou um espectro no ultravioleta destituído dos máximos observados na substância originária, cujo caráter quinonóide é evidente.

O segundo composto, correspondente à terceira faixa amarelo-laranja, depois de recristalizado de benzeno:ligroína e posteriormente de etanol, exibiu cristais aciculares longos e finíssimos, de côr amarelo-canário, agrupando-se em disposição plumoide (fotos 3 e 4), cujas análises justificam a fórmula $C_{16}H_{14}O_3$ (ou $C_{16}H_{12}O_2$). Solúvel em solventes orgânicos como etanol, clorofórmio, benzeno, acetona; pouco solúvel em éter de petróleo; in-

Foto 3

solúvel em água (a frio); solúvel em ácido sulfúrico concentrado com côr vermelho-castanha, passando à côr caramelo, e em seguida, ao pardo e vermelho vinho. Em ácido nítrico, dissolução rápida sem variação da pró-

Foto 4

pria côr da substância. Em solução de soda a 5% a frio, lento aparecimento de débil côr rósea que se intensifica pelo aquecimento. Em solução de carbonato de sódio a 5%, insolúvel a frio; ligeira solubilidade a quente. Negativa a prova do cloreto de ferro. Os agentes redutores descoram ràpidamente suas soluções, as quais voltam lentamente à côr primitiva em presença do ar. As reações com aceto-acetato de etila e com ciano-acetato de etila deram, à semelhança da substância I, côr azul-esverdeada e verde musgo respectivamente. Tollens, positivo. Precipita com 2,4-dinitrofenilhidrazina. Benedict, leve redução. Sua solução em anidrido acético adicionada de pouco ácido sulfúrico, apresenta côr laranja que passa a vermelho-cereja.

A côr amarelo-canário de sua solução etanólica não se modifica por breve atuação de ácido diluído; volvendo-se de imediato por potassa ou soda aquosa a 5% a violeta intenso, com descoramento progressivo. Sua solução alcoólica quando tratada por amônia alcoólica (1:1), passa lentamente (depois de vários segundos) à côr violeta clara. A reação de Ionescu e Craven foi atípica e idêntica à que ocorreu com a substância I.

Seu espectro ultravioleta apresenta máximo em 261 mu (fig. 4).

No infravermelho (fig. 5) as bandas de carbonila 5,97 u e 6,04 u são presentes.

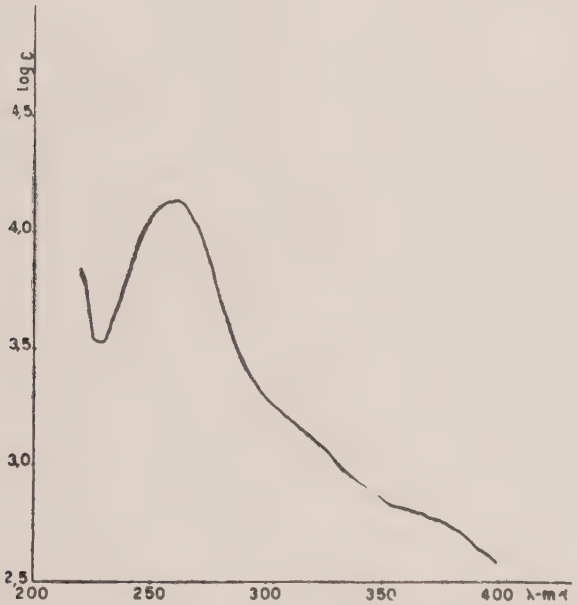


Fig. 4

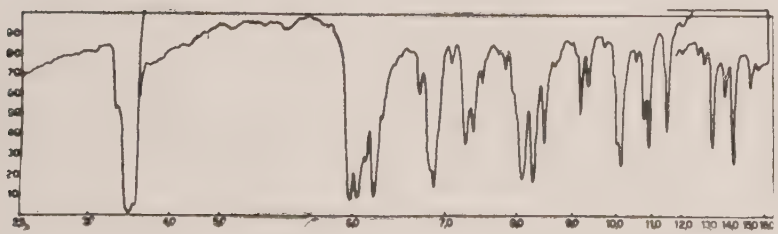


Fig. 5

Também o seu comportamento químico — tal como foi indicado em relação ao composto I — perante álcalis diluídos, cloreto de ferro e acetato de níquel, além da não existência da banda característica no infravermelho, indica a ausência de oxidrila livre em anel aromático..

Igualmente foi demonstrada a presença de grupamentos metoxi por prova qualitativa de Eegriwe (*ibid.*) no destilado do produto de saponificação e determinação quantitativa de um grupo metoxi.

Por acetilação em condições redutoras segundo Brockmann & Budde (*ibid*) obteve-se um di-acetil-dihidro-derivado $C_{20}H_{19}O_5$ cristalino e incolor; cujo espectro de absorção ao UV é visto na fig. 6.

A sua solução diluída, em éter de petróleo (Merck, 40-60°C) exposta à luz solar durante 60 minutos se caracteriza por rápido descoramento com precipitação de substância creme clara, a qual apresenta um espectro no ultravioleta, sem os máximos observados da substância originária.

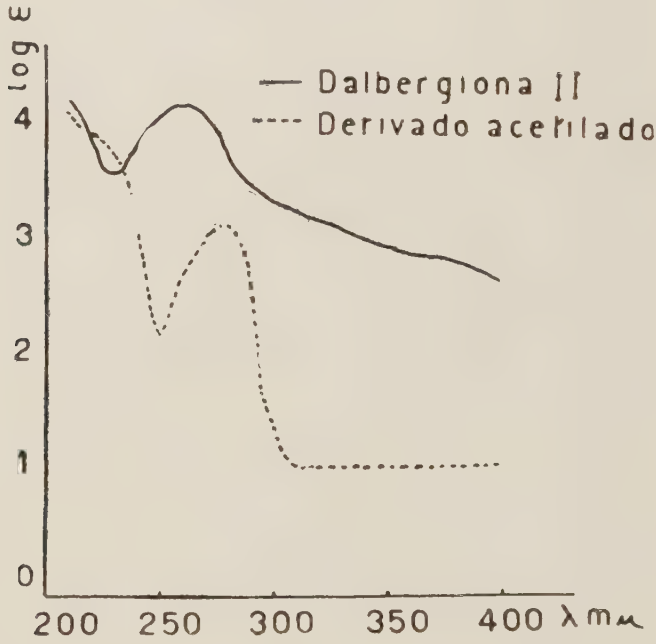


Fig. 6

PARTE EXPERIMENTAL

As análises elementares foram realizadas em nossa secção de análises em aparelho semi-micro Terzano. Amostras da mesma origem foram analisadas também por Dr. W. Manser no "Laboratorium fuer Organische Chemie Eidg. Technische Hochschule. Zuerich".

Substância I — Calculado para $C_{17}H_{16}O_4$: C — 71,83; H — 5,63; PM — 284.
Encontrado: C — 71,5 e 71,37; H — 5,57 e 5,48; PM — 289 (Rast.).

Substância II — No caso da substância II os resultados analíticos oscilam entre a fórmula $C_{16}H_{13}O_3$ por nós encontrada e $C_{16}H_{14}O_3$ correspondente aos dados obtidos por W. Manser.

Calculado para $C_{16}H_{13}O_3$:C — 75,88; H — 5,13 PM — 253..
Encontrado: C — 77,33; H — 5,73; PM — 249,9 (Rast).
Calculado para $C_{16}H_{14}O_3$: C — 75,59; H — 5,51; PM — 254.
Encontrado: C — 77,33; H — 5,63; PM — 250 (Rast).

Determinação de grupos metoxila — Foi utilizado o método de Vieboeck e Schwappach que ofereceu, para a fração I, os seguintes resultados:
Calculado para $C_{15}H_{10}O_2.2OCH_3$: OCH_3 — 22.042.
Encontrado: OCH_3 — 22,520; 22,786.
Com a fração II, seguindo-se o mesmo método de determinação de metoxila os resultados obitdos foram os seguintes:
Calculado para $C_{15}H_{10}O_2.OCH_3$: OCH_3 — 12,253.
Encontrado: OCH_3 — 12,572; 12,366.

Determinação de hidrogênio móvel segundo Tschugaeff-Zerewitinoff. Utilizou-se o aparelho de Roth, com os aperfeiçoamentos introduzidos para eliminar causas de êrro (Pesez & Poirier, 1952). A substância I (recristalizada de clorofórmio: n-heptano e dessecada durante 48 h à temperatura do laboratório (27,5°C) em presença de P_2O_5 ao vácuo), apresentou a frio (22,7°C) desprendimento de metano correspondente a n = 0,53 valor que se elevou pelo aquecimento a 50°C a n = 0,67, e à ebulição n = 0,81.

Amostras obtidas por cristalizações repetidas em etanol a 95% e finalmente por benzeno: éter de petróleo, dessecada como anteriormente, apresentaram os seguintes resultados: a frio (23°C), n = 0; a 50°C, idem.

A substância II, recristalizada de etanol a 95% e dessecada como a anterior, apresentou prova negativa de hidrogênio móvel.

Di-acetil-dihidro-derivado da substância I. A mistura de 190 mg da substância I com 500 mg de zinco em pó, sêco, 40 mg de acetato de sódio recém fundido e 8 ml de anidrido acético, foi aquecida suavemente em refluxo durante 30 minutos. A solução incolor obtida foi vertida em água, deixando-se até o término da hidrólise do anidrido restante e extraindo-se com benzeno. A solução benzênica deixou por evaporação, um resíduo que se purificou por recristalização em éter de petróleo e pelo sistema benzeno:n-heptano, — obtendo-se cristais incolores em forma de aletas, de PF 114,1 — 116,5°C.

A análise foi efetuada do material dessecado a temperatura ambiente ao vácuo, em presença de P_2O_5. Calculado para $C_{21}H_{22}O_6$: C — 68,108; H — 5,945.
Encontrado: C — 67,545; H — 6,015.

Di-acetil-dihidro-derivado da substância II. Foi usado o mesmo método anterior, obtendo-se cristais cúbicos incolores de PF 102,0 — 102,9°C.
Calculado para $C_{20}H_{19}O_5$: C — 70,707; H — 5,601
Encontrado: C — 70,472; H — 5,775.

Desmetilação e prova qualitativa de metanol. Foi empregado o método utili-

zado por Weiss & Nord para a solaniona. 200 mg de cada substância (I e II) foram tratados por 65 ml de NaOH 0,5 N e as soluções obtidas, fervidas em refluxo durante 1:30 h. O precipitado obtido por arrefecimento e acidificação da solução foi separado, utilizando-se o destilado por arraste a vapor da fase líquida para pesquisa de metanol segundo Eegriwe.

O precipitado depois de dissolvido em clorofórmio foi tratado por solução de CO_3HNA a 5%. Os derivados solúveis em meio debilmente alcalino foram obtidos em forma purificada embora não cristalizada. Pela prova do cloreto de ferro, a fração I ofereceu côr vermelha com tonalidade violeta, enquanto a fração II apresentou um resultado duvidoso.

SUMMARY

New results are presented in continuation of a previous research (Gonçalves de Lima, Machado de Albuquerque & Dália Maia, 1959) on the constituents of the heart of Jacarandá wood (*Dalbergia nigra*), with antimicrobian action. Two cristallized antibiotics are studied in this case, one of them with m.p. 109.2-109.5°C which we denominate *Dalbergione I* and another with m.p. 125.7-126.5°C which we have named *Dalbergione II* whose properties are inclued in the group of quinone compounds.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Anschluss an fruehere Forschungsarbeiten (Gonçalves de Lima. Machado de Albuquerque & Dália Maia, 1959) ueber die Zusammensetzung des Kernholzes von Jacarandá (*Dalbergia nigra*) mit antimikrobieller Wirksamkeit werden neue Ergebnisse vorgelegt. Bei dieser Gelegenheit sind zwei neue Antibiotika studiert, eines von ihnen mit F = 109,2-109,5°C welches wir mit *Dalbergion I* benennen, sowie das andere mit einem F = 125,7-126,5°S und welches mit Dalbergion II bezeichnet ist und deren Eigenschaften sie in die Gruppe der Chinonverbindungen einschliessen.

STRESZCZENIE

Ostatnie wyniki badán, poprzednio rozpoczetych (Gonçalves de Lima, Machado de Albuquerque i Dalia Maia 1959) nad rdzeniem drzewa Jacarandá, *Dalbergia nigra*) odkryto srodki przeciw mikrobowe.

W dalszym studiowaniu wykryto dwa krystaliczne antybiotyki, jeden z nich F = 109,2-109,5°C, który jest z Dalbergione I, oraz inny z F = 125,7-126,5°C i z Dalbergione II, które okazuja wlasnosci grupy kompozycji chinowych.

REFERÊNCIAS

ARNSTEIN, H.R., & COOK, A.H. — Production of antibiotics by fungi. Part III. Javanicin. An antibacterial pigment from *Fusarium javanicum*. *Jour. Chem. Soc.* 1021-1028 (1947).

BAMBERGER, E. — Ueber Reten (I). *Ber. dtsch. chem. Ges.* 17: 455 (1884).

BAMBERGER, E. — Ueber eine Farbreaktion von Orthodiketonen. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 18: 865-66 (1885).

BARUA, R. K., & MORTON, R. A. — *Biochem. Journ.* 45 (1949).

BOROSS, L., & FERENCZY, L. — The antibacterial action of somme 1-substituted anthraquinone-2-carboxylic acids. *Naturwissenschaft* 11: 432 (1961).

BROCKMANN, H. & BUDDE, G. — Zur spektroskopischem Identifizierung des Stammkohlenwasserstoffes mehrkerniger Oxy-chinone. *Chem. Ber.* 86 (3): 440 (1953).

CIAMICIAN, G. & SILBER, P. — Chemische Lichtwirkungen. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 34: 1530-1543 (1901).

CRAVEN, R. — *Jour. Chem. Soc. 1931*: 1605 (1931).

EEGRIWE, E. — Mikrochim. Acta 2, 329 (1937); *fide* FEIGL, F.: *Spot Tests*, 339 (1956).

GONÇALVES DE LIMA, O., *et al* — Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* (*Scrophulariaceae*). *Rev. Quím. Indust.* n.º *249*, Rio de Janeiro (1953).

GONÇALVES DE LIMA, O., *et al* — Primeiras observações sôbre a ação antimicrobiana do Lapachol *An. Soc. Biol. Pern.* ns. *1-2*, 129-35 (1956).

GONÇALVES DE LIMA, O., *et al* — Ueber das Biflorin. *Helv. Chim. Acta. 41*(5): 1386-1390 (1958).

GONÇALVES DE LIMA, O., *et al* — Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XIV. Ocorrência de antibióticos em madeiras-de-lei do Brasil. *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife, 2*: 19-33 (1959) .

HINSBERG, O. — Ueber Chinoxaline. *Ber. dtsch. chem. Ges. 17*: 318-23 (1884).

KESTING, W. — Ueber eine einfache Farbreaktion zum Nachweis geringer Unterschiede in den Wasserstoffionen-Konzentrationen von Loesungen. *Zeitschr. Angew. Chem. 41*: 358-60 (1928)

KESTING, W. — Ueber die Reaktion von Malonitril mit α -Naphtho-Chinon. *Zeitschr. Angew. Chem. 41*: 745-48 (1928a).

KESTING, W. — *Ber. dtsch. chem. Ges. 62*: 1422-24 (1929).

KLINGER, H. — Ueber das Isobenzil und die Einwirkung des Sonnenlichts auf einige organische Substanzen. *Ber. dtsch. chem. Ges. 19*: 1862-70 (1886).

KLINGER, H. & STANDKE, O. — Ueber die Einwirkung des Sonnenlichts auf organische Verbindungen. *Ber. dtsch. chem. Ges. 24*: 1340-46 (1891).

KOEGL, F. & ERXLEBEN, H. — *Liebigs Ann. 479*: 11 (1930), *fide* O. HOFFMANN-OSTENHOFF. *Mod. Meth. Pflanzenanal. III*: 363 (1955).

KUHN, R. & ROTH, H. — Mikro-Bestimmung von Acetyl-, Benzoyl- und C-Methylgruppen. *Ber. 66*: 1274-78 (1933).

KULKARNI, A.B. & SHAH, R.C. — Structure of Pristimerin. *Nature, 173*: 1237-38 (1954).

LEHMAN, F. E. — Pruefung zellteilungshemmender Subst. an einen neune Testobjekt. *Verh. Ver. Schweiz Physiol.* 1942, *fide* O. HOFFMANN-OSTENHOFF. *Fortschr. der: Chem. Org. Naturstoffe VI*: 209 (1950).

MACBETH, A. K., PRICE, J. R. & WINZOR, F. L. — The colouring matters of *Drosera Wittakeri*. Part. I. The absorption spectra and colour Reactions of Hydroxy-naphtaquinones. *Jour. Chem. Soc.* 325-338 (1935).

MAZZETI, G. & TESI, A. — *Ann. Sau. Publ. 10* (5): 1206-07 (1949).

MEIER, R. & ALLGOEWER, M. — Zur Charakterisierung zellteilungswirksamer Subst. an der Gewebekultur. *Exper. I*: 57 (1945).

MORGAN, G. Th. & COPPER, E. A. — The baktericide activity of the quinon and allied compounds. *Biochem. Jour. 15*: 587-94 (1921).

NAKANISHI, K., *et al* — Structure of Pristimerin and Celastrol. *Jour. Chem. Soc. 77*: 3169-71 (1955).

NEHER, R. — Chromatography of sterols, steroids and related compounds, *Chromat. Rev.*, 110-111 (1949).

NOVELLI, A. — *Science 93*: 358 (1941) *fide* CAJORI, F. A. *et al*, The *Jour. Biol. Chem. 208*: 113 (1954).

PAOLONI, L. & MARINI-BETTòLO, G. B. — Nuove osservazioni sull'acione della luce *sui chinoni*. *Gazz. Chim. Ital. 87*: 395-402 (1957).

PESEZ, M. & POIRIER, P. — Methodes et Reactions de l'Analyse Organique. I: 158-63 (1952).

PETERSEN, S. *et al* — Synthese einfacher Chinon-Derivate mit fungiziden, baktteriostatischen oder cytostatischen Eigenschaften. *Angew. Chem. 8*: 217-240 (1955).

RANDALL, H. M., R. G. FOWLER N. FUSON *et alii* — Infrared Determination of Organic Structures, *D. Van Nostrand Company, Inc.* Princeton, New Jersey. 165, Jun. 1961.

RAYSTRICK, H. — The Chemistry of Fungi. A region of Biosynthesis. *Eripainos: Suomen Kemistilehti 10* A, 233-35 (1950).

ROBBINS, W. J. *et al* — Antibiotic activity of *Cassia reticulata* Willd. *Bull. Torrey Bot. Club. 74*: 287 (1947).

SANDERMANN, W. & DIETRICHS, H. H.. — Untersuchungen ueber termitenresistente Hoelzer. *Hol. Roh- u. Werkstoff, 15:* 281-97 (1957).

TSCHUGAEFF-ZEREWITINOFF — *Ber. dtsch. chem. Ges. 40*: 2023 (1907).

VIEBOECK, F. & SCHWAPPACH, A. — *B. 63,* 2818, 3207 (1930).

WAKSMAN, S. A. & REILLY, H. C. — Agar-Streak method for assaying antibiotic substances. *Indust. Eng. Chem.* (Anal. Ed.) *17*: 556-59 (1945)

WEISS, S. & NORD, F. F. — On the mechanism of Enzyme Action. XXXVII. Solanione, a pigment from *Fusarium solani* D. Purple. *Arch. Biochem. 22*: 289 (1949).

WILD, F. — Estimation of org. Coumpounds. Cambridge Univ. Press, 219 (1953).

O. Gonçalves de Lima, M. H. Dália Maia, Marisa Machado Albuquerque & Gessé Medeiros Maciel

Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores

Comunicação XVII. Espectros antimicrobianos de alguns flavonóides conhecidos e da brasilina

São apresentados os resultados obtidos acêrca da ação antimicrobiana de alguns flavonóides conhecidos, em comparação com a brasilina.

A atividade antibiótica dos flavonóides* foi apreciada por Bustinza & Lopez (1946), observando que o sal de sódio de quercetina inibe o crescimento de *Bacillus mycoides, Mycobacterium avium, Mycobacterium phlei, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium humanus* e *Staphylococcus aureus.*

Outra contribuição se encontra no trabalho de Naghski, Copley & Couch (1947) sob o título "The antibacterial action of flavonols", no qual se apresenta a ação antimicrobiana do flavonol quercetina contra *Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus, Aerobacillus polymyxa* e *Brucella abortus,* na concentração de 0,075 a 0,10 mg/ml. Na concentração de 0,15 mg/ml foi verificada sòmente inibição parcial com *Streptococcus* dos grupos D e E e os seguintes Gram-negativos: *Escherichia coli, Salmonella oranienburg, Proteus sp., Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas angulata, Pseudomonas tobaci* e *Aerobacter aerogenes.*

Observou-se ademais que a quercetina inibe dèbilmente os fungos, mesmo na concentração máxima anterior. A ação antibacteriana é dependente do pH, sendo desprezível acima de 7,0 e pronunciada a 6,5.

Os glicósides de quercetina como rutina (quercetina-3-rutinóside) e quercitrina (quercetina-3-ramnóside) foram inativos.

Outro flavonoide referido como ativo é datiscetina, 3,5,7,2,-tetrahidroxiflavona, de *Datisca cannabina* (*Datiscaceae*) (Osborn, Peard &

(*) Admitimos com Venkataraman (1959) que o têrmo flavonóide "abarca um grande grupo de compostos de ocorrência natural nos quais dois anéis benzênicos são conectados por uma ponte propano (C_6—C—C—C—C_6), exceto nas isoflavonas, em que a distribiução é C_6—C—C(C_6)(C)".

O têrmo flavonóide inclue, pois, chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, 2-3-dihidroflavonóis (flavononóis), flavan-3,4-dióis (leucoantocianidinas), antocianidinas e catequinas).

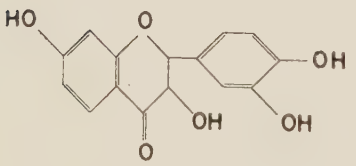
Abraham, 1948). As atividades contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus anthracis* foram respectivamente 1:5000 e 1:10000. A estrutura dêste flavanóide se distingue da quercetina por contar sòmente com uma oxidrila no núcleo benzênico, em posição orto (Korzybski & Kurylowicz, 1961).

H. Uri, G. Csobán & Virágh (1952) investigaram a ação antibacteriana dos flavonóis, verificando que a ramnetina de *Rhamnus spp.*, um éter monometílico (7-metiléter) da quercetina tem o maior efeito, com ação bacteriostática entre 50 e 60 mcg/ml, e bactericida a 100 mcg/ml.

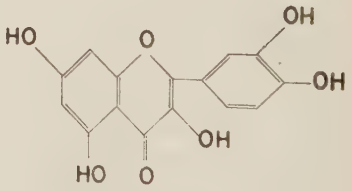
N. W. Nowotelnow e J. S. Jeshow (1954) atribuíram aos glucósides flavônicos a proteção dos grãos em germinação, contra microrganismos como *Bacillus aroidae, Bacillus carotovorus, Pseudomonas xanthochlorum, Pseudomonas heteroceum, Pseudomonas herbicola.*

O estudo do comportamento antimicrobiano de outros representantes conhecidos dêste importante grupo de compostos naturais pareceu-nos útil, não só como uma tentativa de correlação entre sua presença em determinadas espécies botânicas e a resistência que as mesmas ou seus produtos podem oferecer aos agentes fitopatológicos ou deteriorantes, como para estabelecer uma súmula das possibilidades de um grupo de tais compostos como agentes inibidores.

As amostras usadas no presente trabalho foram fornecidas pela organização California Corporation for Biochemical Research, utilizando-se nas provas as substâncias nas mesmas condições de pureza de origem, o que é indicado pelas siglas adotadas pela mesma instituição, designadas por A, B e C em graus de pureza decrescente. Empregou-se na apreciação de atividade antibiótica o método de Waksman & Reilly, sendo os meios de cultivo ajustados ao *p*H 6,6.

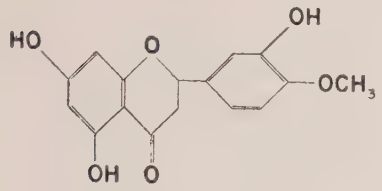


I - FISETINA

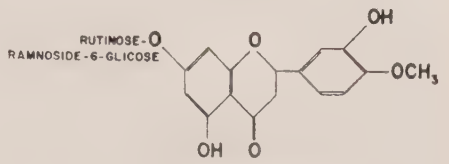


II - QUERCETINA

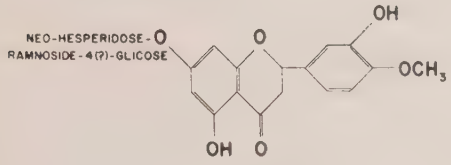
Foram utilizados sete flavonóides, correspondentes às seguintes espécies: fisetina 3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (I), da madeira de *Rhus cotinus* e outras plantas; a quercetina, 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona (II), de diversas espécies botânicas, a flavanona hesperetina, 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavanona (III) e os seus glicósides, hesperidina, 5,3'-dihidroxi-4'-metoxi-7-rutinosiloxiflavanona (IV), constituinte da maioria das plantas cítricas, e a neo-hesperidina (V); a flavanona naringenina, 5,7,4-'trihidroxiflavanona (VI) ou seu glucóside naringina, naringenin-5-ramnóside (VII) encontrado no *Citrus decumana*.



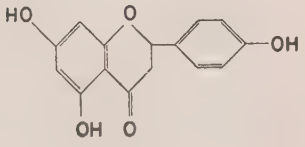
III - HESPERETINA



IV - HESPERIDINA

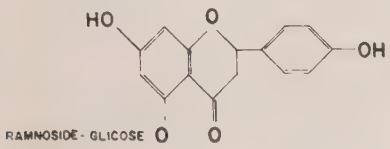


V - NEO-HESPERIDINA

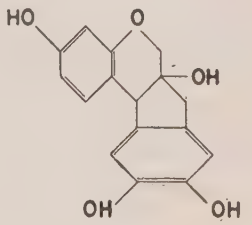


VI - NARINGENINA

Pelo cotejo dos dados apresentados no Quadro I, comprova-se o que referiram Naghski, Copley & Couch acêrca da maior atividade dos flavonóides simples, que os seus respectivos glicósides, o que plenamente se explica considerando-se que a aglucona é a parte ativa. Assim é notável a diferença entre a naringenina em relação à naringina, esta menos eficaz. Do mesmo modo é notável a diferença entre a hesperetina e hesperidina, sobretudo no que se refere às suas atividades contra *Brucella suis*, *Cryptococcus neoformans* e *Polystictus sanguineus*. Com referência à neo-hesperidina, nenhuma atividade se manifestou até 200 mcg/ml, em qualquer microrganismo provado.



VII - NARINGINA



VIII - BRASILINA

Também tivemos oportunidade de provar a atividade antimicrobiana de u'a amostra de brasilina, 3,7,5',6'-tetrahidroxi-indeno-2',1',3,4,-cronomen (3,4)-dihidro (VIII), dada a sua relação constitucional e aparentemente biogenética aos flavonóides (P. Pfeiffer, E. Breith & H. Hoyer, 1931); (W. B. Whalley, 1956); (T. A. Geissman & E. Hinreiner, 1952); (F. Klages, 1958). Em comparação aos flavonóides estudados, distingue-se a brasilina por u'a maior potência contra *Neisseria catarrhalis* (10 — 15 mcg/ml), *Streptococcus hemolyticus e Brucella suis* (15-20 mcg/ml), *Bacillus subtilis* 9 e; *Staphylococcus aureus* W (30 - 40 mcg/ml) e *Mycobacterium phlei* (40 - 60 mcg/ml).

QUADRO I

Atividade antimicrobiana dos flavonóides naringenina, naringina, hesperidina, neo-hesperidina, hesperetina, quercetina, fisetina e da brasilina

MICRORGANISMO	concentração mínima de inibição (mcg/ml)							
	naringenina	naringina	hesperidina	neo-hesperidina	hesperetina	quercetina	fisetina	brasilina
B. subtilis 9	100-150	>200	>200	>200	>200	>200	150-200	30-40
S. aureus W	100-150	>200	>200	>200	>200	>200	80-100	30-40
Str. hemolyticus	100-150	>200	>200	>200	100-150	100-150	150-200	15-20
N. catarrhalis	100-150	>200	>200	>200	>200	>200	150-200	10-15
E. coli R	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
S. typhosa	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Pr. vulgaris	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	150-200
Ps. aeruginosa	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Br. suis	40- 60	100-150	>200	>200	40- 60	100-150	>200	15- 20
Myc. humanus 607	80-100	>200	>200	>200	>200	>200	150-200	>200
Myc. phlei	80-100	>200	>200	>200	100-150	>200	150-200	40-60
N. asteroides	40- 60	>200	T(-)	>200	60- 80	150-200	100-150	80-100
C. albicans IBB-50	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Cr. neoformans	150-200	150-200	150-200	>200	80-100	>200	100-150	150-200
Coccid. immitis	150-200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Asp. niger	100-150	100-150	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Polystictus sanguineus (1 c)	150-200	150-200	>200	>200	80-100	>200	>200	150-200
Pol. sp. (4)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Pol. sp. (10)	150-200	>200	>200	>200	80-100	>200	>200	>200

A ação da fisetina se destacou entre as restantes, em relação aos Gram-positivos *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

Observa-se que os flavonóides não glicosídicos, com exceção da fisetina, foram ativos contra *Brucella suis*, destacando-se a naringenina e a hesperetina (40 - 60 mcg/ml), ainda assim com potência inferior à brasilina, parecendo-nos pois, que a observação de Sanchez-Marroquin (comunicação pessoal) sôbre a ação anti-*Brucella* de extratos de Pau Brasil, *Caesalpinia* (*C. crista, C. brasiliensis, C. echinata, C. sapan*), encontre desta forma sua justificativa.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Ergebnisse der Bestimmungen antimikrobieller Wirksamkeit folgender Flavonoide vorgelegt: Fisetin, Quercetin, Hesperetin, Hesperidin, Neohesperidin, Naringenin, Naringin sowie auch des ihnen vom Standpunkt der Struktur aus nahestehenden Farbstoffes Brasilin.

Es wurde die Beobactung von Naghski, Copley & Couch über die grössere Wirksamkeit der einfachen Flavonoide gegenüber ihrer heterosidischen Abkömmlinge bewiesen, beispielshalber sei das Naringenin bezüglich des Naringin erwaehnt, wobei letzteres weniger aktiv ist.

In gleicher Weise ist der Unterschied zwischen Hesperetin und Hesperidin wichtig, besonders was seine Aktivitaet gegen *Brucella suis, Cryptococcus neoformans* und *Polystictus sanguineus* anbetrifft.

Das Neohesperidin zeigte keinerlei bemerkenswerte Wirksamkeit gegen die gepruelten Mikrooganismen, dies bis zu 200 mcg/ml. Es wurde die antimikrobielle Wirksamkeit des Brasilin bestimmt, welches sich bedeutend wirksamer zeigte als die untersuchten Flavonoide, wobei es scheint, dass die antimikrobielle Wirksamkeit von Extrakten des Brasilholzes (Holz von Pernambuco) gerechtfertig ist.

SUMMARY

The antimicrobial activity of some flavonoids, including fisetin, quercetin, hesperidin, hesperetin, neo-hesperidin, naringenin and naringin, and the related compound brasilin was examined.

The observation of Naghski, Copley & Couch about the stronger antibiotic behaviour of the simple flavonoids as compared with the glycosidic derivatives was confirmed.

The neo-hesperidin does not present significant activity against the tested microorganisms until 200 mcg/ml.

The brasilin showed a greater potency as the presented by the tested flavonoids that justify the observed antimicrobial action of the extracts of Pernambuco timber.

STRESZCZENIE

Przedstawiono wyniki oznaczen przeciwibakteryjnego dzialania nastepujacych flawonoidów: fizetyny, kwercetyny, hesperetyny, hespery dyny, neo-hesperydyny, naryngeniny i narynginy. Podbne dzialanie oznaczono u brazyliny, barwnika o strukturze zblizonej do wyzej wymienionych substancji.

Potwierdzono spostrzezenia Naghski, Copleya i Coucha odnosnie silniejszego dzialania prostych flavonoidów w porównaniu z ich pochodnymi; n.p. stwierdzono silniejsze dzialanie naryngeniny w porównaniu z naryngina.

Podobna róznice stwierdzono miedzy esperytyna i esperydyna, zwlaszcza w ich dzialaniu wobec *Brucella suis, Cryptococcus neoformans* i *Polystictus sanguineus*. Neohesperydyna nie wykazuje przeciwbakteryjnego dzialania wobec badanich drobnoustrojów nawet w stezeniu 200 mcg/ml.

Przeciwbakteryje dzialanie brazyliny jest wyrazniejsze od podobnego dzialania badanych flawonoidów, przyczym wykazano, ze przeciwbakteryjne dzialanie wyciagów drzew brazylijskich (z Pernambuco) jest podobnego rzedu.

REFERÊNCIAS

BUSTINZA & LOPEZ (1946) fide SKINNER, F. A., Antibiotics, *in Mod. Meth. Pflanzenznalyse*, Bd. *III*: 704 (1955).

GEISSMAN, T. A., & HINREINER, E., Theories of the biogenesis of flavonoid compounds. II. Com. *Bot. Rev. 18*: 165-244 (1952) .

KARRER, W., Über das Vorkommen von Hesperidin und Neohesperidin in unreifen Pomeranzen und in den Fruchtknoten und Narben der Pomeranzen-Blüten. *Helv. Chim. Acta XXXII* Fasc. *III*, n.º *94*: 714-717 (1949).

KLAGES, F., Lehrbuch der organischen Chemie *Bd. III*, 170 (1958).

KORZYBSKI, R., & KURYLOWICZ, W., Antibiotica. Veb. Gustav Fischer Verlag Jena 1009 (1961).

NAGHSKI, J., *et al.*, The antibacterial action of flavonols. *Jour. Bact.* 54, 34 (1947).

NOWOTELNOW, N. W., & JESHOW, J.S., Über die antibiotischen und antioxydativen. Eigenschaften des gelben Pigments des Getreidekorns. *Ber. Akad. Wiss. UdSSR*, (N. S.), *99*: 297-300 (1954). *Chem. Zentralbl.* 8414 (1955).

OSBORN, PEARD & ABRAHAM (1948) *fide* SKINNER, F.A., Antibiotics, *in Mod. Meth. Pflanzenanalyse*, Ed. *III*: 676-77 (1955).

PFEIFFER, P., *et al.*, Oxybenzylchromanone II Mit. Zur Brasilin- und Haematoxylinfrage. *Jour. Prakt. Chem.* |2| *129*: 31-54 (1931).

URI, J., *et al.*, Die antibakterielle Wirkung des Flavonolfarbstoffes Rhamnetin. *Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung. 2*, 223-27 (1951). *Chem. Zentrabl.* 4468 (1952).

VENKATARAMAN, K., Flavones and Isoflavons. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe. XVII*. 3,4 (1959).

WAKSMAN, S.A., & REILLY, H. C., Agar-streak method. *Ind. Eng. Chem. Analyt. Ed. 17*: 556 (1945).

WHALLEY, W. B., The Biogenese of Brasilin and Hematoxylin. *Chem. and Ind. 6/10*: 1049-50 (1956).

O. Gonçalves de Lima & M. H. Dália Maia

Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores

Comunicação XVIII. Sôbre uma substância corada, com ação contra Mycobacterium, isolada do cerne do Barabu (*Peltogyne recifensis* Ducke)

De extrato do cerne de *Peltogyne recifensis* Ducke foi isolada uma substância em forma cristalizada, com propriedades antimicrobianas. Seu comportamento parece situá-la entre os compostos flavonóides.

No decurso de nossos trabalhos de investigação sôbre atividade antimicrobiana de extratos de lenhos de espécies da flora regional, foi isolada uma substância incolor quando recém-cristalizada, passando gradativamente a uma coloração variegada — entre violeta-rósea e violeta — do cerne de côr violeta-púrpura da madeira denominada Barabu (*Peltogyne recifensis* Ducke) que ocorre em Pernambuco, tanto nas florestas virgens, como nas formações secundárias (D. de Andrade Lima, 1954; Sérgio Tavares, 1959).

O material cristalizado apresentou moderada ação antibiótica contra cêpas do gênero *Mycobacterium* e *Nocardia* e de forma ainda mais discreta contra *Bacillus mycoides, Sarcina lutea, Neisseria catarrhalis, Brucella suis* e *Candida stellatoidea*.

EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E PROPRIEDADES

A serragem do cerne vermelho-violeta da madeira do Barabu foi extraída a frio, até esgotamento, por etanol a 95%. O resíduo do extrato alcoólico por evaporação a vácuo à temperatura ambiente, foi tomado por acetona. A solução assim obtida, foi tratada por benzeno até precipitação total do material vermelho-pardo escuro, que se descartou. Ao sobrenadante amarelo dourado, foi continuada a adição de benzeno até nova turvação de material claro, deixando-se no refrigerador por 40 horas quando se constatou presença de depósito vermelho de aspecto graxo, e de cristais de côr creme claro, ou mesmo quase incolores, fixos às paredes do bécher; êstes cristais foram redissolvidos em acetona e novamente precipitados da forma anterior, por benzeno, obtendo-se u'a messe de cristais (fotos 1 e 2), então de tonalidade violeta leve que se intensificou durante as operações de filtração, lavagem e dessecação em um aglomerado de coloração matizada, do violeta claro ao roxo.

Observou-se que os mesmos cristais obtidos por recristalização de acetona: benzeno ou acetona: éter de petróleo apresentavam coloração diversificada do cinza-azulado leve ao violeta, de tal sorte que os seus conglomerados cristalinos se mostravam variegados, sobretudo se expostos ao ar em estado úmido. A substância incompletamente purificada se modifica ao aquecimento sem fundir, a partir de 100°C, passando pelas côres rósea e roxa a 130°C, até o negro a 250°C. Amostra purificada por cristalização fracionada de acetona: ligroína, apresentando-se como substância quase incolor (ligeira tonalidade violeta) escureceu pelo aquecimento a partir de 160°C, tornando-se negra a 265°C, sem fundir. $\alpha_D^{27°C} = +208°$ (acetona 50%).

Foto 1

É solúvel nos solventes metanol, butanol e acetona; pouco solúvel em éter etílico e muito pouco solúvel em clorofórmio e benzeno. Muito pouco solúvel em água a frio. Pouco solúvel em ácido clorídrico a 1% a frio; mais solúvel a quente com côr rósea PL-2: G-4 (Dictionary of Color, Maerz & Paul, 1950). Mesmo quando quase incolor, a substância, se tratada por ácido clorídrico em concentração superior, a quente, produz uma brilhante coloração vermelha e turvação.

Em presença de reativos redutores, a sua coloração alcoólica violeta é ràpidamente descorada, voltando à côr primitiva com certa rapidez em presença do ar. Lassaigne, negativo. Tollens positivo. Benedict, positivo fraco.

Schiff, negativo. Pela adição de algumas gotas de solução de cloreto de ferro à sua solução alcoólica, se produz côr verde-musgo intensa, a qual, por adição de amônia passa a vermelho-púrpura. Por soda 0,1 N desenvolve-se côr amarela que passa a laranja. Pelo teste de Shinoda ocorre já pela acidificação por ácido cloridrico a coloração magenta correspondente a PL-52:K-12 (Maerz & Paul, *op. cit.*). Bargellini, verde folha. Molisch, duvidoso (interferência da côr da substância).

Foto 2

O seu comportamento perante o esquema de Robinson & Robinson (1931) para análise rápida de antocianinas em extratos de plantas foi o seguinte: o extrato amílico da fase aquosa, adicionado de acetato de sódio apresentou côr azul que por tratamento com cloreto de ferro (III) aquoso descorou passando ao amarelo por ligeiro excesso de reativo. Com o reagente "cianidina" ofereceu o mesmo extrato amílico, côr violeta-rosada clara. Pelo teste de oxidação houve modificação irreversivel. O reagente

"delfinidina" extrae completamente a substância corante da solução aquosa clorídrica (1%).

A sua solução acética adicionada de algumas gôtas de ácido sulfúrico produz imediata coloração vermelho-fucsina. Por ácido nítrico, vermelho alaranjado. Solução de Cl_3Al em etanol absoluto, dá coloração castanho-âmbar com intensa fluorescência verde.

Seu PM (Rast) apresentou valores em derredor de 288. A ausência de grupo alcoxílico foi demonstrada pelo método de Vieboeck & Schwappach. Calculado para $C_{15}H_{14}O_6$: C — 62,068; H — 4,827; PM — 200.
Encontrado: C — 62,804; H — 4,936; PM 287,76.

O espectro de absorção (fig. 1) apresenta um máximo situado em 282 mu,

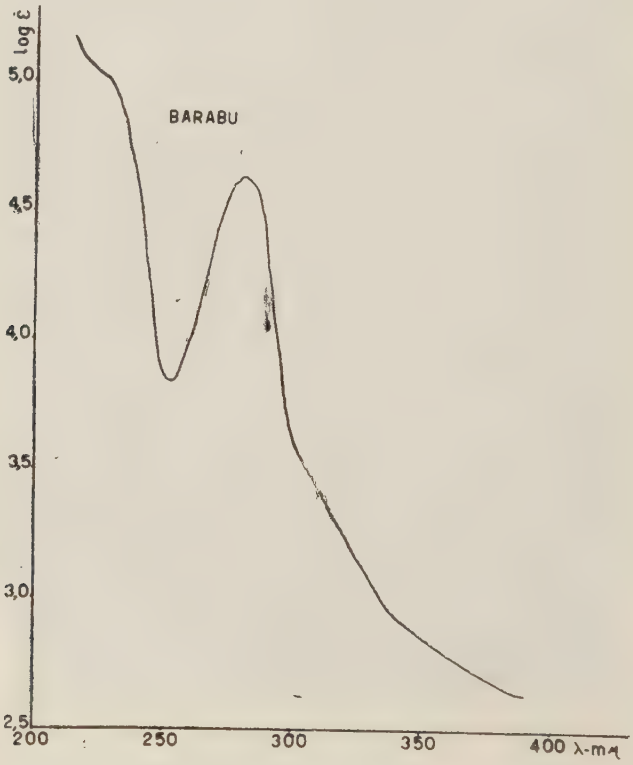


Fig. 1

isto é, na região característica das catequinas (3, 5, 7, 3',4'-pentahidroxiflavano) e de leucoantocianidinas que apresentam os máximos típicos dos fenóis polihídricos em que não tem lugar conjugação carbonila (Geissman, 1955).

O seu comportamento já referido, perante ácido concentrado a quente, corresponde ao comportamento das leucoantocianidinas, segundo M. M. Bokadia (1961).

A atividade antimicrobiana se destaca sòmente pela desproporção entre o seu comportamento débil para a maioria dos germes provados, enquanto se oferecem valores relevantes perante as espécies de *Mycobacterium* (quadro I).

QUADRO I

Atividade antimicrobiana da substância isolada do cerne violeta-púrpura do barabu

MICRORGANISMOS	concentração mínima de inibição (mcg/ml)
Bacillus subtilis	250
Bacillus anthracis	200 — 250
Bacillus mycoides	250
Staphylococcus aureus	250
Sarcina lutea	200 — 250
Streptococcus hemolyticus	250
Neisseria catarrhalis	200 — 250
Escherichia coli N	250
Salmonella typhosa	250
Klebsiella pneumoniae	250
Pseudomonas aeruginosa	250
Proteus morganii	250
Brucella suis	200 — 250
Mycobacterium humanus	80 — 100
Mycobacterium phlei	20 — 40
Mycobacterium smegmatis	60 — 80
Nocardia asteroides	60 — 80
Candida albicans	250
Candida stellatoidea	200 — 250
Cryptococcus neformans	250

SUMMARY

A crystallized flavonoid with antibiotic properties was isolated from the timber heart of the tree named Barabu (*Peltogyne recifensis* Ducke) that grows in the humid forest of Pernambuco.

The ultraviolet spectrum of the compound shows a peak at 282 mu, just in the proper region of the catechins and leucoanthocyanidins.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die ersten erhaltenen Ergebnisse ueber das chemische und antibiotische Verhalten eines Flavonoides vorgelegt, welches gegen *Mycobacterium spp* aktiv ist und im kristallinen Zustand aus dem Kernholz des mit Barabu (*Peltogyne recifensis* Ducke) benannten Baumes erhalten wurde. Gennanter Baum ist eme Eigenart der Waelder des Staates Pernambuco.

Das ultraviolette Spektrum der Substanz zeigt eine Absorptionsbande von 282 mu, welche den Catechinen und Leukoanthocyanidinen eigen ist.

STRESZCZENIE

Ponizej otrz pierwsze wyniki mane przez chemiczne i antybiotyczne docie kania z Flowonojdami, które przez Mykobakterie spp. aktywne w postaci krystalicznej zostaly osiagniete z rdzenia drzewa Barabu (*Peltogyne recifensis* Ducke).

Wyciag tej substancji wykazuje asimyilowanie ultrafioletowe 282mu, które jest jednakowe z Catechinem i Lenkoanthocyanidinem.

REFERENCIAS

BOKADIA, M. M., Chemistry of Leucoanthocyanidins. *Jour. Indian. Chem. Soc. 38* (8): 616-20 (1961).

GEISSMAN, T. A., Anthocyanins, Chalcones, Aurones and Flavones. *Mod. Meth. Pflanzenanal. III*: 494 (1955).

LIMA, D. de ANDRADE, Contribution to the study of the flora of Pernambuco, Brasil. Recife, Univ. Rural de Pernambuco, 1954, pág. 154.

MAERZ, A. & PAUL, M. R., A Dictionary of Color. 2nd Ed. McGraw-Hill Book Co., Inc. (1950).

ROBINSON, G. M. & ROBINSON, R., *Biochem. J. 25*: 1687-1705 (1931).

TAVARES, S., Madeiras do Nordeste do Brasil. Recife, Univ., Rural de Pernambuco, 1959, pág. 74.

VIEBOECK, F. & SCHWAPPACH, A., *Ber. dtsch. chem. Ges. 63*: 2818. 3207 (1930).

Ivan Leôncio d'Albuquerque, O. Gonçalves de Lima &
Maria Célia P. Navarro

Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores

Comunicação XIX. Ocorrência de antimicrobianos nas fôlhas do Tramanhen da Praia. (*Vernonia scabra*).

INTRODUÇÃO

Verificou-se que o extrato acetônico das fôlhas do vegetal vulgarmente denominado Tramanhen da Praia apresenta atividade antibacteriana contra *S. aureus* em provas de discos de papel de filtro e não sofre qualquer modificação, mesmo quando aquecido a 100°C durante 30 minutos nos pH 2,0 e 6,0. Com a realização do papirograma sumário modificado (Gonçalves de Lima, 1959), usando-se o mesmo extrato acetônico e o mesmo germe de prova, ficou demonstrado tratar-se de um único princípio ativo. (fig. 1).

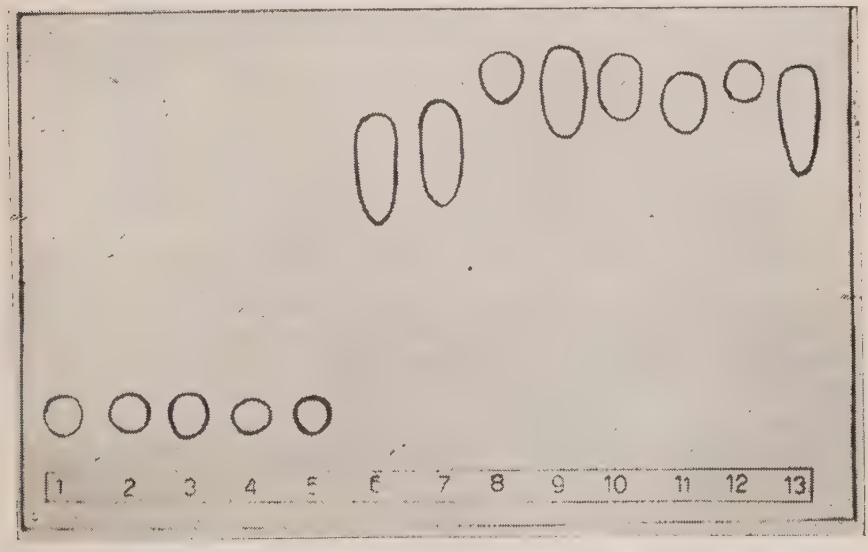


Fig. 1

PARTE EXPERIMENTAL

Iniciou-se a purificação tratando o resíduo da evaporação do extrato acetônico por metanol a 70%, centrifugando-se, dissolvendo-se o resíduo com metanol e precipitando-se por água. Separado o sobrenadante, o precipitado depois de dissolvido com metanol e evaporado a sêco, foi tomado por etanol saturado de ligroína e tratado em funil separador, várias vêzes, com ligroína saturada de etanol. O produto obtido da evaporação do extrato ligroínico, sofreu uma partição com 9 tubos, utilizando-se o sistema etanol: ligroína. Separadas as hipofases das epifases, foram feitas as provas de Waksman & Reilly, constando-se que as dos tubos 4 e 5 encerravam as frações de melhor atividade, que, depois de reunidas e evaporadas, forneceram o produto que serviu para realização do espectro que é visto no quadro I.

QUADRO I

Espectro antimicrobiano da fração ativa

MICRORGANISMOS	concentração mínima de inibição (mcg/ml)
Bacillus subtilis 9	> 20,0
Staphylococcus aureus W	6,0 — 8,0
Streptococcus hemolyticus	> 100,0
Sarcina lutea	10,0 — 20,0
Escherichia coli R	> 100,0
Shigella paradysenteriae	> 100,0
Mycobacterium tub. var. *hom.*	> 100,0
Mycobacterium smegmatis	> 100,0
Mycobacterium phlei	> 100,0
Brucella suis	20,0 — 40,0
Candida albicans	> 100,0
Pseudomonas aeruginosa	> 100,0

A substância se apresenta insolúvel em água, em solução de carbonato ácido de sódio a 5%, em solução de ácido clorídrico a 5% e em ácido fosfórico a 85%. Solúvel em ácido sulfúrico concentrado apresentando coloração marrom avermelhada. Pouco solúvel em solução de hidróxido de sódio a 5%, tomando coloração vermelha e deixando um resíduo semi-sólido amarelado. As provas com os reativos de Fehling e Tollens resultaram positivas.

RÉSUMÉ

On présente un principe actif antimicrobien qui existe dans les feuiles de Tramanhen da Praia (*Vernonia scabra*) comme observation préalable.

SUMMARY

Preliminary observations on one antibiotic obtained from the leaves of Tramanhen da Praia (*Vernonia scabra*).

ZUSAMMENFASSUNG

Vorgelegt wird eine vorlaeufige Mitteilung ueber ein antimikrobiell aktives Prinzip, welches aus den Blaettern von Tramanhen da Praia (*Vernonia scabra*) gewonnen wurde.

REFERENCIAS

GONÇALVES DE LIMA, O., *et al.* — Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores. Comunicação XIV. Ocorrência de Antibióticos em Madeiras-de-Lei do Brasil. *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife 2* (1/2): 19-52 (1959).

O. Gonçalves de Lima, I. Leôncio D'Albuquerque, M. H. Dália Maia & M. A. Pereira Borba

Ação da Luz Sôbre a Biflorina

A sensibilidade da biflorina à ação da luz solar mesmo difusa foi por nós observada durante os primeiros trabalhos de isolamento e purificação dêsse antibiótico, quando verificámos o descoramento de suas soluções em alguns solventes orgânicos e suas misturas, quando em ambiente iluminado por luz natural.

Recentemente (1960) durante uma visita do Professor Marini-Bettòlo ao nosso Instituto, tivemos ocasião de ouví-lo sôbre o comportamento da gonileptidina (2,3-dimetil-1,4-benzoquinona) pela ação da luz solar.

Na mesma oportunidade, aquêle ilustre investigador realizou com a biflorina o singelo experimento de expôr sua solução em éter de petróleo à luz difusa, verificando-se o seu rápido descoramento.

Deve-se a L. Paoloni e Marini-Bettòlo (1957) uma importante contribuição ao problema da foto-sensibilidade de quinonas, fato anteriormente referido por Klinger (1886, 1891) e quase concomitantemente por G. Ciamician (*fide* Paoloni & Marini-Bettòlo, *ibid.* 396).

Lograram êstes dois pesquisadores italianos demonstrar que o produto branco em que se transforma por ação da luz a gonileptidina, isto é, 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona, se constitui fundamentalmente de 2,3-dimetil-1,4-hidroquinona.

Em nosso presente informe buscámos de uma parte observar a ação biológica do derivado resultante da luz sôbre a biflorina em solução de éter de petróleo, e de outra, a modificação provocada no seu espectro de absorção no ultravioleta (figs. 1 e 2).

A atividade antimicrobiana da biflorina se manifesta principalmente contra Gram-positivos e ácido-resistentes, entre os quais *Staphylococcus citreus, Sarcina lutea, Bacillus mycoides e Mycobacterium phlei* são os mais sensíveis (O. Gonçalves de Lima, Leoncio D'Albuquerque *et al.*, 1953, 1958).

Entre os Gram-negativos, sua atividade só é relevante contra *Brucella spp*, sendo observada em amostra purificada por partição Craig, uma ação medíocre contra *Pseudomonas aeruginosa.*

Em relação ao gênero *Candida* os resultados obtidos *in vitro* com amostras conseguidas pelos primeiros métodos de isolamento por nós empregados ofereciam atividades entre 80 e 100 mcg/ml, embora as observações clínicas sempre revelassem uma "alta eficácia terapêutica" (Serpa, 1958).

Recentemente em amostras obtidas por novo método de extração a quente, desenvolvido por um de nós (Leôncio D'Albuquerque), é excelente a atividade demonstrada contra *Candida* (1,6 — 3,2 mcg/ml).

Em nosso experimento foi empregada u'a amostra obtida por extração a quente, oferecendo um espectro antimicrobiano que se vê no quadro I, primeira coluna.

Para a obtenção do derivado da biflorina por ação da luz, foi utilizado o solvente indicado por Paoloni & Marini-Bettòlo, ou seja, éter de petróleo

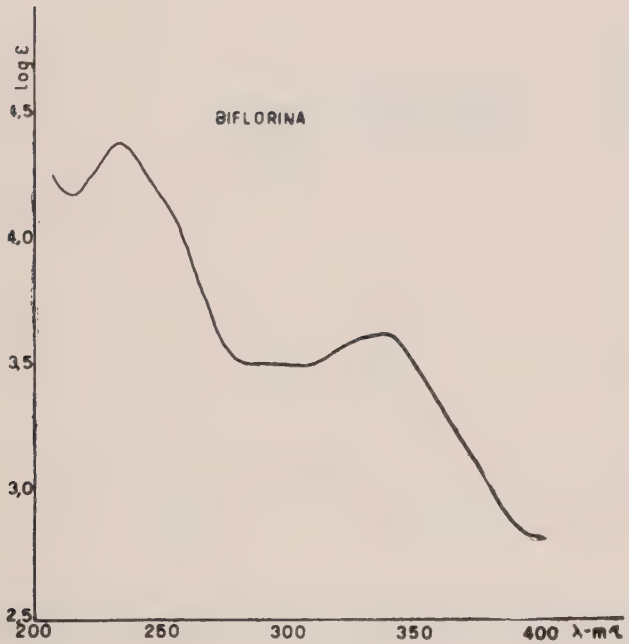


Fig. 1

(Merck, faixa de ebulição 40-60°C), pela comodidade que oferece a insolubilidade do produto formado.

A solução empregada possuia a concentração de biflorina de 0,003g %, sendo a duração de exposição à luz solar de 70 minutos.

Observou-se que o material de côr creme claro precipitou já aos primeiros minutos. Após completo desaparecimento da coloração da biflorina em solução, foi separada por centrifugação a substância depositada que se lavou com éter de petróleo, dissolvendo-se em acetona e se reprecipitando por

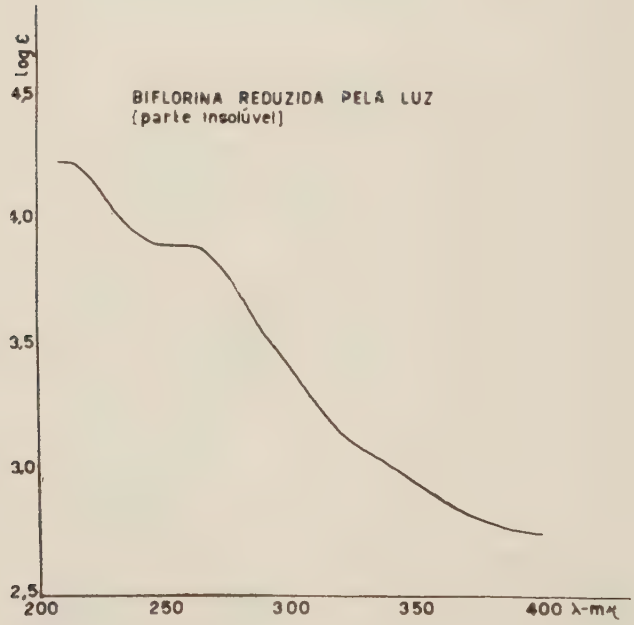


Fig. 2

éter de petróleo e utilizando-se o produto assim obtido para as provas biológicas e espectrofotométricas.

No quadro I se observam as atividades das amostras de biflorina e do produto em que se transformou pela ação da luz.

Também foi verificado que a fração que permaneceu solubilizada em éter de petróleo, bastante modificada a julgar pelo desaparecimento da côr característica da biflorina original e pelo seu espectro no ultravioleta (fig. 3),

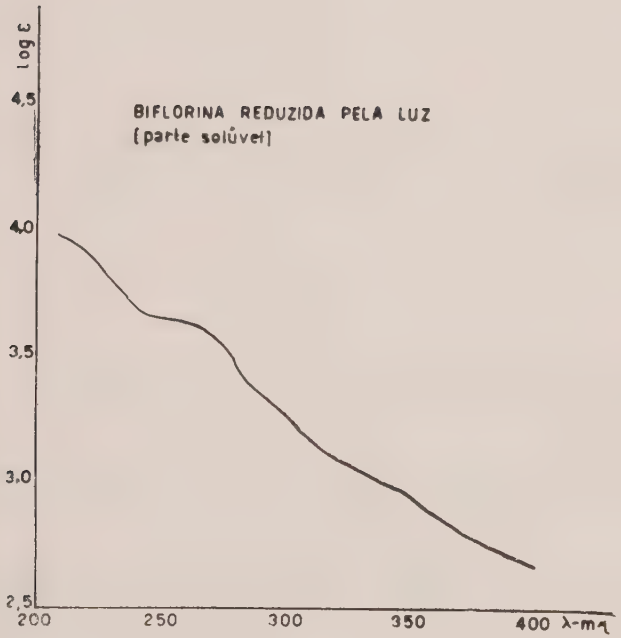


FIG. 3

apresentou atividade antibiótica superior ao produto insolúvel no referido solvente (quadro I, terceira coluna).

QUADRO I

MICRORGANISMOS	Biflorina pura	Biflorina modificada pela luz natural	
		Insolúvel em éter de petróleo	Solúvel em éter de petróleo
Bacillus subtilis 9	0,8 — 1,2	50,0	8,0 — 10,0
Staphylococcus aureus	1,2 — 1,6	50,0	6,0 — 8,0
Sarcina lutea	0,1 — 0,2	40,0 — 50,0	1,0 — 2,0
Streptococcus hemolyticus	20,0	50,0	50,0
Escherichia coli N	20,0	50,0	50,0
Brucella suis	3,2 — 4,0	30,0 — 40,0	10,0 — 20,0
Mycobacterium humanus	20,0	50,0	40,0 — 50,0
Nocardia asteroides	6,0 — 8,0	50,0	10,0 — 20,0
Candida albicans	1,6 — 3,2	50,0	8,0 — 10,0
Cryptococcus neoformans	20,0	50,0	50,0

REFERÊNCIAS

GONÇALVES DE LIMA, O., I. LEÔNCIO D'ALBUQUERQUE, P. LOUREIRO, L. CARMONA, M. ZAPATA BENARD — Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora*. *Rev. Quím. Ind.*: 249 (1953).

GONÇALVES DE LIMA, O., I. LEÔNCIO D'ALBUQUERQUE, B. MAGALHÃES NETO, MARISA MACHADO ALBUQUERQUE — Breve nota sôbre a atividade antimicrobiana da biflorina purificada por partição Craig. *Rev. Inst. Antib. Univ. Recife*, *2*: 95-97 (1958).

KLINGER, H. — Ueber das Isobenzil und die Einwirkung des Sonnenlichtes auf einige organische Substanzen. *Ber. dtsch. chem. Ges. 19*: 1862-1870 (1886).

KLINGER, H. & O. STANDKE — Ueber die Einwirkung des Sonnenlichts auf organische Verbindungen. *Ber. dtsch. chem. Ges. 24*: 1340-46 (1891).

PAOLONI, L. & G. B. MARINI-BETTOLO — Nuove osservazioni sull'azione della luce sui chinoni. *Gazz. Chim. Ital. 87*: 395-402 (1957).

SERPA, J. — Tricosporonose cutânea curada com Biflorina. *An. Fac. Med. Univ. Recife. 18*: 33-7 (1958).

COMISSÃO DE REDAÇÃO

Oswaldo Gonçalves de Lima
Francisco Décio de Andrade Lyra
Maria Helena Dália Maia

O Instituto de Antibióticos — órgão da Universidade do Recife — foi fundado pelo Conselho Universitário, em sessão de 8 de março de 1952 por proposta do Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima então Diretor da Escola Superior de Química.

Êste periódico é dirigido pelo Instituto de Antibióticos e publicado pela Imprensa da Universidade do Recife (Brasil), destinando-se especialmente à divulgação dos resultados das atividades científicas do mencionado Instituto.

Anteriormente à sua criação, a maioria de tais resultados vinha sendo publicada nos Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco.

Merecerá sempre a melhor acolhida tôda colaboração de interêsse científico e enquadrada em a natureza desta revista, oferecida por investigadores — nacionais ou estrangeiros — que desejem utilizá-la como veículo de divulgação de seus trabalhos no campo dos antibióticos.

Trabalhos anteriormente publicados pelo Instituto de Antibióticos:

ALBUQUERQUE, M. MACHADO, O. GONÇALVES DE LIMA, M. C. PINTO NAVARRO *et alii* — Sôbre um antibiótico de espectro restrito produzido por um *Streptomyces* (Cult. N.º 721). *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1 (2): |89|-94, dez. 1958. Ilust., tab. Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

BENARD, M. ZAPATA, O. GONÇALVES DE LIMA, J. O. F. DE MORAIS *et alii* — Estudo de um *Streptomyces sp.* (Cêpa K-7 do Instituto de Antibióticos) ativo contra *Mycobacterium spp.* e *Escherichia coli* R. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco*, 11(1):11-14, jul. 1953. Ilust., tab.

CIFERRI, O. & L. A. ARAÚJO — Estudo sôbre a nutrição de *Hemispora stellata* (*Sporendonema epizoum*). *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(1):11-21, jan. 1958. Tab. Resumo em português e inglês. Bibliografia.

CIFERRI, O. & M. P. MACHADO — Produzione de pigmenti flavinici da parte di un Attinomicete. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(1):39-51, jan. 1958. Tab. Sumário em itálico e Inglês. Bibliografia.

CIFERRI, O., M. P. MACHADO & L. A. ARAÚJO — Substâncias antimicrobianas na Canafístula (*Cassia excelsa* Schrad) II. Cassilisidina, um antibiótico de ação bacteriolítica. Revista do Instituto de Antibióticos, Recife, 1(1):33-37, jan. 1958. Tab. Resumo em português e inglês. Bibliografia.

GOMES, A. DE PAULA — Observações sôbre a utilização de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver & Van Niel, 1936. (*Thermobacterium mobile* Lindner 1928: *Pseudomonas Lindneri* Kluyver & Hoppenbrouwers, 1931) na terapêutica humana. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 2 (1/2): |77|-81, dez. 1959. Sumário em inglês, alemão e francês. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O. — Sôbre uma interessante e pouco conhecida publicação de Paul Lindner acêrca do emprêgo terapêutico de *Zymomonas mobilis* Kluyver & Van Niel, 1936 (*Pseudomonas Lindneri*). *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(2): |119|-124, dez. 1958. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O. & I. L. D'ALBUQUERQUE — Método simples de extração e purificação da biflorina, *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(1):7-9, jan. 1958. Tab. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O. & J. M. CALDAS — Alamandina, novo antibiótico ativo contra protozoários, isolado de *Allamanda violacea* (*Apocynaceae*). *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 12(1): |19|-26, set. 1954. Ilust., tab. Resumo em português, inglês e alemão.

GONÇALVES DE LIMA, O. & M. P. MACHADO — Breve nota sôbre a atividade antibiótica de amostras de raízes de *Aristolochia foetida*, após longo estágio em herbário. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 13(2): |48|-51, dez. 1955. Ilust., tab. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., M. G. MACIEL, M. P. MACHADO *et alii* — Algumas observações sôbre a ação antifúngica de um *Streptomyces sp.* (Cêpa 233 — IAUR). *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(1): 3-6, jan. 1958. Tab. Resumo em português e alemão.

GONÇALVES DE LIMA, O., M. H. D. MAIA, J.O.F. DE MORAIS *et alii* — Antibiótico antifúngico produzido por *Streptomyces* (Cêpa Am-154 IAUR). *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 15(1): 133-139, jul. 1957. Tab. Resumo em português e alemão.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, P. LOUREIRO *et alii* — Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* (*Scrophulariaceae*). Resumo da comunicação feita, em setembro de 1952, à Sociedade de Biologia de Pernambuco. *Revista de Química Industrial*, Rio de Janeiro, 22 (249): |1|-3, jan. 1953.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, B. MAGALHÃES NETO *et alii* — Breve nota sôbre a atividade antimicrobiana da biflorina, purificada por partição Craig. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(2): |95|-97, dez. 1958. Tab. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., I L. D'ALBUQUERQUE, E. J. DA COSTA *et alii* — Cultivação de *Candida utilis* em caldas de destilarias de Pernambuco. *Anais da Escola Superior de Química*, Recife, 1(1): |67|-82, dez. 1959. Ilust., Tab. Resumo em alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., L. A. ARAÚJO, J. O. F. DE MORAIS *et alii* — Estudo sôbre a Eurimicina, antibiótico produzido pelo *Streptomyces sp.* (Cêpa 7K1 do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife). II. Comunicação. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 12(1): |9|-17, set. 1954. Tab. Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., L.A. ARAÚJO, J. O. F. DE MORAIS *et alii* — Estudo sumário de um *Streptomyces* (cêpa 7K1 do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife). I. Comunicação. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 12(1): |3| - 7, set. 1954. Tab. Resumo em português, inglês e alemão.

GONÇALVES DE LIMA, O., J. O. F. DE MORAIS & M. H. D. MAIA — Estudos de microrganismos encontrados em leitos de despejos de caldas de destilarias de Pernambuco. I. Determinação taxonômica de algumas leveduras muito frequentes. *Anais da Escola Superior de Química*, Recife, 1(1): 7-13 dez. 1959. Tab. Resumo em português, inglês e alemão.

GONÇALVES DE LIMA, O., M. H. D. MAIA & I. L. D'ALBUQUERQUE — Estudos de microrganismos encontrados em leitos de despejos de caldas de destilarias de Pernambuco III. Sôbre uma nova variedade de *Torulopsis inconspicua*: *Torulopsis inconspicua* Lodder var. *thermotolerans* Lima, D. Maia & D'Albuquerque. *Anais da Escola Superior de Química, Recife*, 1(1): |21|-31, dez. 1959. Ilust., Tab. Resumo em francês, inglês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA ,O., E. MAIA & I. L. D'ALBUQUERQUE — A heterocultivação de microrganismos em substratos contendo várias fontes de carbono. *Anais da Escola Superior de Química*, Recife 1(1): |55|-66, dez. 1959. Ilust. Resumo em francês, inglês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., J. O. F. DE MORAIS, M. Z. BENARD *et alii* — Isolamento e estudos preliminares de uma substância antibiótica produzida por um *Streptomyces sp.* (Cêpa K-7 do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife). *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 11(1): 15-17, jul. 1953. Tab.

GONÇALVES DE LIMA, O., J. O. F. DE MORAIS & C. L. CARMONA — Nova

espécie de gênero *Acetobacter: A. lermae. Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 13(1): |13|-17, set. 1955. Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., M. P. MACHADO, L. A. ARAÚJO *et alii* — Nova espécie do gênero *Nocardia: N. recifei*, sua atividade antagonista. Antibiótico produzido. I. Comunicação. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 13(1): |21|-36, set. 1955. Ilust., Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE & P. LOUREIRO — Novas observações sôbre a Biflorina — antibiótico isolado da *Capraria biflora* L (*Scrophulariaceae*). *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 11(1): 3-9, jul. 1953. Sumário em alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., P. LOUREIRO & J. O. F. DE MORAIS — Observações preliminares sôbre um antibiótico produzido por um *Streptomyces sp* (Cêpa A-24 do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife). *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 12(1): |33|-37, set. 1954. Resumo em português, inglês e alemão.

GONÇALVES DE LIMA, O., M. H. D. MAIA & M. M. DE ALBUQUERQUE — Observações sôbre a atividade antagonista de alguns basidiomicetos isolados em Pernambuco. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 2(1/2): |83|-97. Ilust., Tab. Resumo em francês, inglês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, A. ANDRADE *et alii* — Primeiras observações sôbre a ação antibacteriana de extratos de amêndoas de *Virola gardneri*. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 13(1): |3|-12, set. 1955. Ilust., tab. Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, M. P. MACHADO *et alii* — Primeiras observações sôbre a ação antimicrobiana do Lapachol. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 14(1/2): |129|-135, dez. 1956. Tab. Sumário em inglês. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., M. P. MACHADO, G. P. PINTO *et alii* — Primeiras observações sôbre dois antibióticos de espectro restrito, produzidos por *Streptomyces sp.* (Cêpa A 116 IAUR). *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 13(2): |125|-129, dez. 1955. Tab.

GONÇALVES DE LIMA, O., M. P. MACHADO, J. O. F. DE MORAIS *et alii* — Primeiras observações sôbre um antibiótico do grupo da estreptotricina. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 13(2): |3|-10, dez. 1955. Ilust., tab. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, P. LOUREIRO *et alii* — Selovicina, novo antibiótico isolado de *Croton sellowii* Baill. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 12(1): |27|-31, set. 1954. Tab., Resumo em português, inglês e alemão.

GONÇALVES DE LIMA, O., J. O. F. DE MORAIS, M. H. D. MAIA *et alii* — O *Streptomyces* produtor do antibiótico Eurimicina — Cêpa 7K1 do IAUR — identificado como *S. levendulae*. Ligeiro estudo crítico sôbre algumas espécies do grupo *S. levendulae*. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 14 (1/2): |68|-75, dez. 1956. Tab. Resumo em português e inglês. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., J. A. BANDEIRA, M. M. DE ALBUQUERQUE *et alii* — Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XII. Sôbre um interessante antibiótico de natureza acídica, encontrado no caule de uma liana das matas de Pernambuco. (*Aristolochia sp.*) *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(2): 107-117, dez. 1958. Ilust., Tab. Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, M. M. ALBUQUERQUE *et alii* — Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XIII — Notícia sôbre a atividade antibacteriana e antifúngica de alcalóides isolados de uma espécie de *Tabernaemontana* (*Apocynaceae*) vegetando na faixa costeira ao norte de Olinda, Pernambuco. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(1/2): |3|-17, dez. 1959. Ilust., tab. Resumo em inglês francês e alemão. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., M. M. DE ALBUQUERQUE & M. H. D. MAIA — Substâncias anitmicrobianas de plantas superiores. Comunicação XIV. Ocorrência de antibióticos em madeiras-de-lei do Brasil. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 2(1/2): |19|-51, dez. 1959. Ilust., tab. Resumo em inglês, alemão e francês. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, M. M. DE ALBUQUERQUE *et alii* — Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XV. Sôbre a ocorrência de antimicrobianos com ação contra *Candida spp.* em cascas do caule e de raízes de "Sabiazeira" *Miconia sp.* (*Melastomaceae*). *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 2(1/2): |53|-61, dez. 1959 Ilust., tab. Sumário em inglês, alemão e francês. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, M. P. MACHADO *et alii* — Substâncias antimicrobianas na Canafístula (*Cassia excelsa* Schrad). I. Cassilisina, um novo alcalóide com ação antibiótica. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(1): 23-31, jan. 1958. Ilust., tab. Resumo em português. Bibliografia.

GONÇALVES DE LIMA, O., W. KELLER-SCHIERLEIN & V. PRELOG — Ueber das Biflorin. *Helvetica Chimica* Acta 41(5): |1386|-1390, Aug. 1958. Ilust. Resumo.

GONÇALVES DE LIMA, O., I. L. D'ALBUQUERQUE, M. P. MACHADO *et alii* — Uma nova substância antibiótica isolada do "Pau d'Arco", *Tabebuia sp. Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 14(1/2): |136|-140, dez. 1956. Ilust., tab. Sumário em inglês.

LYRA, F. D. DE ANDRADE, M. M. DE ALBUQUERQUE, O. GONÇALVES DE LIMA *et alii* — Erigrisina — um antibiótico produzido por *Streptomyces* (*S. erythrogriseus* Morais & D. Maia). *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 2 (1/2): |99|-107, dez. 1959. Ilust., tab. Sumário em inglês e alemão. Bibliografia.

MAGALHÃES, B., O. GONÇALVES DE LIMA, A. M. DE ALMEIDA *et alii* — A utilização de carbohidratos e outras substâncias nutritivas por *Zymomonas mobilis* (= *Pseudomonas Lindneri*), cêpa Agll isolada em 1951. *Anais da Escola Superior de Química*, Recife, 1(1): |83|-88, dez. 1959. Tab. Resumo. Bibliografia.

MAIA, M. H. DÁLIA, O. GONÇALVES DE LIMA & J. O. F. DE MORAIS — Estudos de microrganismos encontrados em leitos de despejos de caldas de destilarias de Pernambuco. IV. — *Prototheca tropicalis*: Nova espécie de *Prototheca*. *Anais da Escola Superior de Química*, Recife, 1(1): |33|-40, dez. 1959. Ilust., tab. Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, M. H. D. MAIA & M. E. S. M. GENN — Sôbre uma variedade de *Streptomyces* comum nos solos do Brasil: *Streptomyces venezuelae* var. *roseospori* Nov. var. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(2): |99|-106, dez. 1958. Tab. Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, & M. H. D. MAIA — Estudos de microrganismos encontrados em leitos de despejos de caldas de destilarias de Pernambuco. II. Uma nova espécie de *Hansenula*: H. *polymorpha*. *Anais da Escola Superior de Química*, Recife, 1(1): |15|-20, dez. 1959. Ilust., Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, & M. H. D. MAIA — *S. erythrogriseus*: novo *Streptomyces* produtor de antibiótico. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 2(1/2): |63|-67, dez. 1959. Tab. Sumário em inglês e alemão. Bibliografia.

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, O. GONÇALVES DE LIMA & M. H. D. MAIA — Novo estudo sôbre *Nocardia recifei* Lima *et alii* e sua designação como *Streptomyces recifensis*. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 15(1): 239-253, jul. 1957. Ilust.., tab. Resumo em português, inglês e alemão. Bibliografia.

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, O. GONÇALVES DE LIMA & M. H. D. MAIA — *Streptomyces* A20 (IAUR) — produtor de um antibiótico do grupo da estreptotricina — identificado como *S. cinnamonensis*. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 14(1/2): |9|-15, dez. 1956. Resumo em português e inglês. Bibliografia.

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, M. H. D. MAIA & M. E. S. M. GENN — Um estudo taxomônico em tôrno do *Streptomyces lavendulae* — *S. lavendulae* var. *brasilicus* nov. var. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife 1(2): |69|-87, dez. 1958. Tab. Sumário em inglês e alemão. Bibliografia.

MORAIS, J. O. FALCÃO DE, O. GONÇALVES DE LIMA, M. P. MACHADO *et alii* — Uma cêpa de *Streptomyces californicus* (Waksman & Curtis) Waksman & Henrici (1) produtora de um corante antibiótico, indicador ácido-básico. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 14(1/2): |1|-8, dez. 1955. Tab. Resumo em português e inglês. Bibliografia.

SANCHEZ-MARROQUÍN, A. — *Streptomyces* di amplio espectro antimicrobiano, aislado de suelos de Brasil. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(1): 53-63, jan. 1958. Tab. Sumário em inglês. Bibliografia.

SILVA, E., L. L. DE OLIVEIRA & M. S. BISPO — Da ação da alil-iso-propilacetilcarbamida ("Sedormid") e do peróxido de hidrogênio administrados isolados e conjuntamente sôbre o desenvolvimento do carcino-sarcomo de Walker 256. *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife*, 2(1/2): |109|-114, dez. 1959. Tab. Sumário em inglês, alemão e francês. Bibliografia.

SILVA, E., K. PINTO & E. FONTES — Da ação da glucurolactona e do glucuronato de sódio no desenvolvimento do carcinosarcomo de Walker 156. "Nota prévia". *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 1(2): |131|-134, dez. 1958. Sumário em inglês, francês e alemão. Bibliografia.

SILVA, E., L. L. DE OLIVEIRA & M. S. BISPO — Da ação do carbonato dietílico no desenvolvimento do carcino-sarcoma de Walker 256. Considerações sôbre o mecanismo carcinostático da uretana. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 2(1/2): |115|-118, dez. 1959. Sumário em inglês, alemão e francês. Bibliografia.

SILVA, E., L. L. DE OLIVEIRA, M. S. BISPO *et alii* — Novos dados sôbre a *Urensina* complexo antibiótico isolado do córtex radicular de "*Cnidoscolus urens*" (L) *Euphorbiaceae*. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 2(1/2): |68|-75, dez. 1959. Ilust., tab. Sumário em inglês, alemão e francês. Bibliografia.

SILVA, E., O. GONÇALVES DE LIMA, M. M. DE ALBUQUERQUE — Primeiras observações sôbre um antibiótico com propriedades de indicador ácido-básico isolado de *Cnidoscolus urens* — *Euphorbiaceae*. *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife*, 1(2): |125|-129, dez. 1958. Tab. Resumo em português, inglês e alemão.

Recife. Universidade. *Instituto de Antibióticos.*
Revista do Instituto de Antibióticos. v. 1—
jan. 1958— Recife, Universidade do Recife [Imprensa Universitária] 1958—

v. ilust. 23 cm semestral.

1. Antibióticos — Periódicos. I. Título.

615.32905 (C.D. 16. ed.) Univ. do Recife
615.779(05):061.6 (C.D.U.) S.C.B. 60-937